

Die Rolle von ICOS für die T-Zell-Effektorfunktion in vivo

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Chemikerin Yvonne Burmeister

geboren am 18.05.1982 in Dresden

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter:

1. Prof. Dr. Andreas Radbruch
2. Prof. Dr. Richard Krocze
3. Dr. Michal Or-Guil

eingereicht: 05.11.2008

Tag der mündlichen Prüfung: 17.04.2009

Meinem Großvater

Zusammenfassung

Der Induzierbare Kostimulator (ICOS) ist ein wichtiger Regulator der T-Zell-Effektorfunktion. *In vivo* führt ein Defekt von ICOS zur Beeinträchtigung der T-Zellabhängigen humoralen Immunität. In gendefizienten Mäusen wurden stark gestörte B-Zellantworten beobachtet und humane ICOS-Defizienz-Patienten sind kaum noch in der Lage, Memory B-Zellen auszubilden. Mehrere *in vitro* und *in vivo* Studien führen diese Phänomene auf eine beeinträchtigte Regulation von Kommunikationsmolekülen auf der Zelloberfläche und Expression von Zytokinen durch ICOS-defiziente T-Zellen zurück. In dieser Arbeit konnte jedoch anhand Antigen-spezifischer T-Zellen in einem murinen adoptiven Transfersystem gezeigt werden, dass das Signal über ICOS die frühe T-Zellaktivierung nicht signifikant beeinflusst. Stattdessen trägt ICOS wesentlich zum Überleben und zur Expansion von Effektor T-Zellen bei, die zuvor lokal durch Antigengabe mit Adjuvanz induziert wurden. Diese beobachtete biologische Funktion von ICOS lässt sich auch auf FoxP3⁺ Regulatorische T-Zellen übertragen, welche durch systemische Antigengabe ohne Adjuvanz generiert wurden. In Übereinstimmung mit diesem Befund führt die Abwesenheit von ICOS unter homöostatischen Bedingungen in nicht-immunisierten Mäusen zu reduzierten Zellzahlen von Effektor-Memory T-Zellen und FoxP3⁺ Regulatorischen T-Zellen. Der regulierende Effekt von ICOS auf die Größe einer spezifischen Effektor T-Zellpopulation gilt auch für Follikuläre T-Helferzellen, konnte jedoch für zytotoxische CD8⁺ T-Zellen nicht eindeutig nachgewiesen werden. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse kristallisiert sich eine globale biologische Rolle von ICOS für Effektorzellen heraus. Als kostimulatorisches, agonistisches Molekül reguliert ICOS generell die Pool-Größe aller Effektor T-Zellen mit unterschiedlichen, teilweise gegensätzlichen funktionellen Eigenschaften. Mit Hilfe dieses neuen Konzeptes können frühere *in vivo* Studien, deren Ergebnisse in Bezug auf die Funktion von ICOS scheinbar widersprüchlich waren, in Einklang gebracht werden.

Schlagerworte: ICOS, Kostimulation, T-Zellen, Apoptose, *in vivo* Mausmodell

Abstract

The Inducible Co-Stimulator (ICOS) is an important regulator of T cell effector function. *In vivo* ICOS deficiency results in impaired T-cell dependent humoral immunity. Knock-out mice show strongly defective B cell responses and human ICOS deficiency patients hardly possess any memory B cells. Several *in vitro* and *in vivo* studies attributed this phenomenon to impaired upregulation of cell surface communication molecules and cytokine synthesis by ICOS-deficient T cells. However, in this work now could be shown with antigen-specific T cells in a murine adoptive transfer system that signaling via ICOS does not significantly affect early T cell activation. Instead, ICOS substantially contributes to the survival and expansion of effector T cells upon local challenge with antigen and adjuvant. Importantly, the observed biological function of ICOS also extends to FoxP3⁺ regulatory T cells, as can be observed after systemic antigen delivery without adjuvant. In line with these findings, absence of ICOS under homeostatic conditions of nonimmunized mice leads to a reduced number of both effector-memory and FoxP3⁺ regulatory T cells. The regulatory function of ICOS to control the poolsize of special T cell effector populations is also observed for follicular B helper T cells. The influence of ICOS on cytotoxic CD8⁺ T cells could not be clearly demonstrated. Based on these results, I propose a biological role for ICOS as a costimulatory, agonistic molecule for a variety of effector T cells with differing and partly opposing functional roles. This concept may reconcile a number of past *in vivo* studies with seemingly contradictory results on ICOS function.

Keywords: ICOS, costimulation, T-cells, apoptosis, *in vivo* mouse model

*„We absolutely must leave room for doubt
or there is no progress and no learning.
There is no learning without having to pose a question.
And a question requires doubt.“
Richard P. Feynman (1918-1988)*

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	<i>i</i>
Abstract	<i>ii</i>
Inhaltsverzeichnis	<i>iv</i>
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	<i>vii</i>
1 Einleitung	1
1.1 Die Rolle kostimulatorischer Moleküle	1
1.2 ICOS und ICOS-L	3
1.3 T-Zellsubpopulationen	5
1.3.1 Effektor und Memory Antwort von T-Zellen	5
1.3.2 Regulatorische T-Zellen	7
1.3.3 Follikuläre T-Helferzellen	8
2 Material und Methoden	10
2.1 Mäuse	10
2.2 Tierexperimentelle Methoden	10
2.2.1 Adoptiver Transfer von Zellen	10
2.2.2 Immunisierung von Tieren	11
2.2.3 <i>In vivo</i> -Blockade mit Antikörpern	11
2.3 Zellbiologische Methoden	11
2.3.1 Isolierung muriner Zellen	11
2.3.2 Durchflusszytometrie	12
2.3.3 Magnetische Sortierung von murinen Zellen	15
2.3.4 Sortierung von Zellen mittels Durchflusszytometrie	16
2.3.5 Zellproliferations- und Zellzyklus-Assays	16
2.3.6 Apoptose-Assays	17
2.3.7 <i>In vitro</i> -Restimulation von Zellen	17
2.3.8 Zytokin Sekretions Assay	17
2.4 Molekularbiologische Methoden	18
2.4.1 Präparation von RNA und cDNA-Synthese	18
2.4.2 Durchführung von TaqMan-Arrays	18
2.5 Statistische Analysen	19

3	<i>Ergebnisse</i>	20
3.1	ICOS hat keinen Einfluss auf die Zahl der T- und B-Lymphozyten sowie Dendritischen Zellen	20
3.2	Effektor-Memory und Regulatorische T-Zellen stellen charakteristische ICOS^{high} Expressoren dar	22
3.3	ICOS KO Mäuse besitzen weniger Effektor-Memory und Regulatorische T-Zellen	23
3.4	Die <i>de-novo</i> Generierung von Regulatorischen T-Zellen im Thymus wird von ICOS nicht beeinflusst	25
3.5	ICOS trägt entscheidend zur Expansion und Differenzierung Antigen-spezifischer Effektorzellen bei	26
3.5.1	Einführung des verwendeten adoptiven Transfersystems	26
3.5.2	Der Aktivierungszustand einer Zelle ist unabhängig von ICOS	27
3.5.3	ICOS ist entscheidend für die Expansion transgener T-Zellen	29
3.6	ICOS beeinflusst die Expansion von Antigen-spezifischen Regulatorischen T-Zellen	31
3.7	Der Zellzyklusverlauf zeigt sich von ICOS unbeeinträchtigt	32
3.8	ICOS reguliert die Apoptose transgener CD4⁺ T-Zellen	34
3.9	Die Expansion von CD4⁺ T-Zellen durch homöostatische Proliferation wird von ICOS positiv beeinflusst	36
3.10	ICOS reguliert die Expansion und das Überleben von Follikulären T-Helferzellen	37
3.10.1	Detektion und Charakterisierung von Follikulären T-Helferzellen	37
3.10.2	Die Entwicklung Follikulärer T-Helferzellen ist ICOS-abhängig	39
3.10.3	ICOS allein, nicht PD-1, ist entscheidend für die Existenz der Follikulären T-Helferzellen	40
3.11	Expression von Zytokinen	41
3.11.1	Zytokinprofil von ICOS ^{high} CD4 ⁺ T-Zellen	41
3.11.2	Antigen-spezifische T-Zellen und ihre Zytokine	42
3.12	Auf der Suche nach dem Mechanismus	44
3.12.1	Untersuchung von ausgewählten Überlebensfaktoren	44
3.12.2	Etablierung einer Sortierungsstrategie für transgene T-Zellen	45
3.12.3	Die Expression immunologisch relevanter Gene wird von ICOS nicht beeinflusst	47
3.13	Für zytotoxische CD8⁺ T-Zellen nimmt die Kostimulation über ICOS einen anderen Stellenwert ein	49
3.13.1	Die ICOS Expression von Effektor-Memory CD8 ⁺ T-Zellen beeinflusst nicht deren Populationsgröße	49
3.13.2	Die Proliferation transgener CD8 ⁺ T-Zellen ist von ICOS unabhängig	50

3.13.3	Der Einfluss von ICOS auf die Expansion der CD8 ⁺ T-Zellen durch homöostatische Proliferation	51
4	<i>Diskussion</i>	53
4.1	ICOS steuert die Populationsgröße von Effektor-Memory und Regulatorischen CD4 ⁺ T-Zellen	53
4.2	Überlebenskomponente ICOS – Der Einfluss auf das Leben einer Effektor T-Zelle	53
4.3	Hilfe für B-Zellen – Die ICOS Kostimulation unterstützt Follikuläre T-Helferzellen	56
4.4	Der Einfluss von ICOS auf Zytokine	58
4.5	Dem Mechanismus auf der Spur	59
4.6	Der Stellenwert von ICOS für die CD8 ⁺ T-Zelle	61
4.7	Die biologische Funktion von ICOS – Das Konzept	62
	<i>Literaturverzeichnis</i>	64
	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	76
	<i>Danksagung</i>	78
	<i>Publikationen</i>	79
	<i>Lebenslauf</i>	80
	<i>Eidesstattliche Erklärung</i>	81

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Kostimulatorische Moleküle _____	2
Abb. 2: T-Zellsubpopulationen _____	5
Abb. 3: B-Zellhilfe durch Follikuläre T-Helferzellen _____	9
Abb. 4: Durchflusszytometrische Analyse _____	12
Abb. 5: Untersuchung von ICOS KO Mäusen auf T-, B- und Dendritische Zellen _____	21
Abb. 6: Charakterisierung der ICOS-Expression auf T-Zellsubpopulationen _____	22
Abb. 7: Regulatorische und Effektor-Memory T-Zellen in ICOS KO Mäusen _____	24
Abb. 8: Regulatorische T-Zellen im Thymus von ICOS KO Mäusen _____	25
Abb. 9: Antigen-spezifisches adoptives Transfersystem _____	27
Abb. 10: Analyse von Aktivierungsmarkern auf den transgenen Zellen _____	28
Abb. 11: Expansion Antigen-spezifischer T-Zellen _____	29
Abb. 12: CFSE-Markierung der transgenen T-Zellen zur Beurteilung der Proliferation _____	30
Abb. 13: Analyse Antigen-spezifischer Regulatorischer T-Zellen _____	31
Abb. 14: Analyse der Kurzzeit Proliferation durch BrdU Einbau _____	33
Abb. 15: Zellzyklusanalyse transgener T-Zellen _____	34
Abb. 16: Bestimmung des Überlebens Antigen-spezifischer T-Zellen _____	35
Abb. 17: Homöostatische Proliferation adoptiv transferierter T-Zellen _____	37
Abb. 18: Detektion von Follikulären T-Helferzellen _____	38
Abb. 19: Anzahl und Expansion von Follikulären T-Helferzellen _____	39
Abb. 20: Suppression der Expansion von Follikulären T-Helferzellen _____	40
Abb. 21: Zytokinexpression von CD4 ⁺ ICOS ^{high} T-Zellen _____	41
Abb. 22: Zytokinexpression von Antigen-spezifischen T-Zellen _____	42
Abb. 23: IL-2 Expression Antigen-spezifischer Zellen _____	43

Abb. 24: Überlebensmarker auf Effektor-Memory und Regulatorischen T-Zellen	44
Abb. 25: Überlebensmarker auf Antigen-spezifischen T-Zellen	45
Abb. 26: Sortierungsstrategien von transgenen T-Zellen	46
Abb. 27: Durchführung von TaqMan-Arrays	48
Abb. 28: ICOS-Expression auf CD8 ⁺ T-Zellsubpopulationen und Populationsanalyse	49
Abb. 29: Expansion Antigen-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen	51
Abb. 30: Homöostatische Proliferation von CD8 ⁺ T-Zellen	52
Tab. 1: Verwendete Antikörper	13
Tab. 2: Genutzte Fluorophore und ihre Emissionsspektren	15

1 Einleitung

1.1 Die Rolle kostimulatorischer Moleküle

Für eine effektive T-Zellantwort ist die alleinige Erkennung des spezifischen Antigens durch den T-Zellrezeptor nicht ausreichend. Zusätzliche kostimulatorische Signale sind notwendig, um die T-Zellaktivierung zu verstärken und damit eine optimale Antwort der T-Zelle zu bewirken (Bretscher 1999). Mit Hilfe des Zusammenspiels dieser zwei Signalkomponenten ist das Immunsystem in der Lage, Selbstantigene von Nicht-Selbstantigenen zu unterscheiden (Bretscher und Cohn 1970). Ursprünglich dachte man, dass das zusätzliche Signal nur durch einen einzigen membrangebundenen Rezeptor vermittelt wird, dessen intrazelluläre Signaltransduktion sich von der des T-Zellrezeptors unterscheidet (Ledbetter et al. 1990). Heute wissen wir, dass der Prozess der Kostimulation wesentlich komplexer ist. Eine angemessene T-Zellantwort erfordert die optimale Balance von kostimulatorischen und koinhibitorischen Signalen um einerseits protektive Immunantworten zu verstärken und andererseits die immunologische Toleranz aufrecht zu erhalten und vor Autoimmunität zu schützen. In den letzten Jahren wurde eine Reihe von kostimulatorischen Molekülen entdeckt, die die T-Zellantwort verstärken oder inhibieren, das Überleben steuern oder Effektorfunktionen wie Zytokinsekretion oder Zytotoxizität regulieren. Zudem wurde deutlich, dass kostimulatorische und T-Zellrezeptor-vermittelte Signale durchaus einen identischen Signalweg haben können. Es existieren demnach Effekte quantitativer Natur, durch Verstärkung des T-Zellrezeptor-vermittelten Signalweges, aber auch qualitativer Natur, indem zusätzlich T-Zellrezeptor fremde Signale in die T-Zelle erfolgen (Ohnishi et al. 1995; Raab et al. 1995).

Die meisten Rezeptor-Ligandenpaare mit kostimulatorischer Funktion gehören strukturell entweder zur Immunglobulin oder zur Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNFR) Superfamilie. Die aus der Gruppe der Immunglobulin Superfamilie am besten untersuchten Ligand-Rezeptorpaare sind B7.1/B7.2-CD28/CTLA-4. CD28 (Aruffo und Seed 1987) ist das prototypische Molekül der sogenannten CD28 Familie, welche die Mitglieder der Immunglobulin Superfamilie mit einer einzigen Immunglobulin V ähnlichen Domäne beinhaltet. B7.1 (Freeman et al. 1991) und B7.2 (Azuma et al. 1993) besitzen eine duale Spezifität für CD28 und den inhibitorischen Rezeptor CTLA-4 und sind der B7 Familie zuzuordnen, dessen Mitglieder sich durch eine Immunglobulin V ähnliche und eine Immunglobulin C ähnliche Domäne auszeichnen (Brunet et al. 1987).

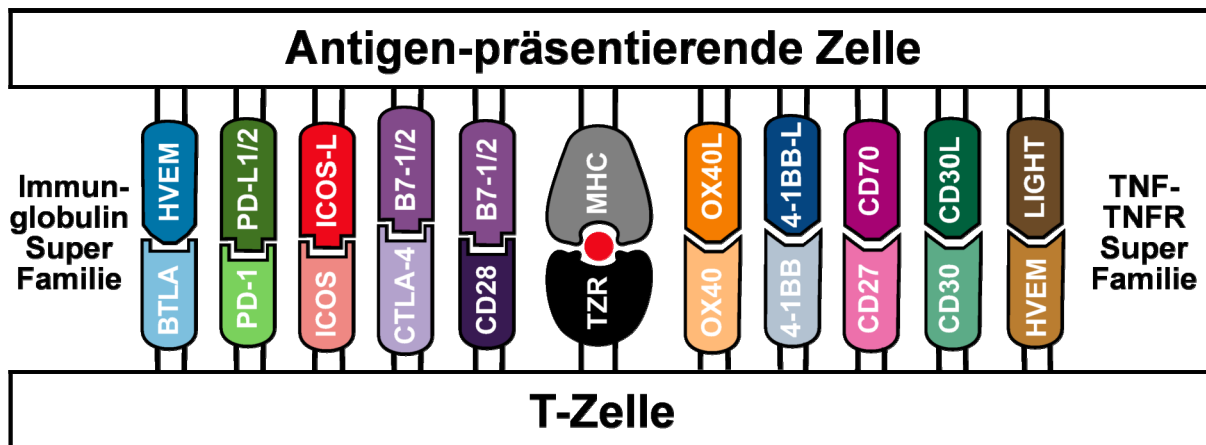


Abb. 1: Kostimulatorische Moleküle

Schematische Darstellung von Rezeptor-Ligandenpaaren, die bei der Interaktion zwischen T-Zelle und Antigen präsentierender Zelle kostimulatorische oder koinhibitorische Signale vermitteln. Die Interaktion von BTLA mit HVEM ist ein Sonderfall, in dem ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie mit einem Mitglied der TNF-TNFR Superfamilie interagiert. TZR – T-Zellrezeptor, MHC – Haupthistokompatibilitätskomplex

Während CD28 konstitutiv auf der T-Zelloberfläche exprimiert wird (Gross et al. 1992), erfolgt die CTLA-4 Expression nur nach T-Zellaktivierung (Linsley et al. 1996). CTLA-4 stellt den höher affinen Rezeptor für die beiden Liganden dar. Das aktivierungsinduzierte B7.1 (Freeman et al. 1993) und das konstitutiv exprimierte B7.2 (Hathcock et al. 1994) unterstützen die T-Zellantwort durch Signale über CD28, welche das Überleben und die Zytokinausschüttung fördern (Boise et al. 1995; Shahinian et al. 1993; Sperling et al. 1996). Insbesondere die durch CD28 initiierte Produktion von IL-2 führt zur Verlängerung des Überlebens aktivierter T-Zellen. CTLA-4 inhibiert dagegen die IL-2 Synthese, den Zellzyklusverlauf und beendet die T-Zellantwort (Brunner et al. 1999; Greenwald et al. 2001; Krummel und Allison 1995; Walunas et al. 1996). CTLA-4 defiziente Mäuse entwickeln eine fatale lymphoproliferative Krankheit (Waterhouse et al. 1995), welche durch die unkontrollierte B7.1/B7.2 Kostimulation hervorgerufen wird und die Wichtigkeit von CTLA-4 als negativen Kostimulator unterstreicht.

Eine Dekade nach CD28 wurde das Molekül Induzierbarer Kostimulator (ICOS) als weiteres Mitglied der CD28 Familie entdeckt (Hutloff et al. 1999). Der einzige Ligand von ICOS wird mit den Namen ICOS-L, B7h, GL50, B7RP-1, LICOS und B7-H2 bezeichnet (Brodie et al. 2000; Ling et al. 2000; Mages et al. 2000; Swallow et al. 1999; Wang et al. 2000; Yoshinaga et al. 1999). PD-1 ist schon länger bekannt, wurde aber erst nach Entdeckung der zugehörigen Liganden PD-L1 oder B7-H1 (Dong et al. 1999; Freeman et al. 2000) und PD-L2 oder B7-DC

(Latchman et al. 2001; Tseng et al. 2001) zur CD28 Familie gezählt. PD-1 wird von aktivierten T und B-Zellen exprimiert (Agata et al. 1996). PD-L1 wird konstitutiv und nach Aktivierung auf T und B-Zellen, Makrophagen und Dendritischen Zellen exprimiert, während PD-L2 nur auf Makrophagen und Dendritischen Zellen induziert wird (Dong et al. 1999; Freeman et al. 2000). Der autoimmune Phänotyp von PD-1 defizienten Mäusen weist auf eine inhibitorische Funktion des Moleküls hin (Nishimura et al. 1999). Es ist sehr wahrscheinlich, dass PD-1 die T-Zellhomöostase reguliert, da PD-L1 defiziente Mäuse zur Akkumulation von T-Zellen neigen (Dong et al. 2004). Die Rolle von PD-L2 wird jedoch kontrovers diskutiert (Latchman et al. 2001; Shin et al. 2003). Weitere Mitglieder der Immunglobulin Superfamilie, die in den vergangenen Jahren identifiziert werden konnten sind: B7-H3 (Chapoval et al. 2001), B7-H4 (Sica et al. 2003; Zang et al. 2003) und BTLA (Watanabe et al. 2003). Aus der Gruppe der TNF-TNFR Superfamilie haben 5 kostimulatorische Liganden-Rezeptorpaare in den letzten Jahren besondere Prominenz erzielt: OX40-OX40L, 4-1BB-4-1BB-L, CD27-CD70, CD30-CD30L und HVEM-LIGHT. Die Rezeptormoleküle dieser Familie sind alle Typ I Transmembranproteine, welche sich durch verschiedene extrazelluläre Cystein-reiche Domänen auszeichnen (Bodmer et al. 2002). Die zugehörigen Liganden, Typ II Transmembranproteine, besitzen jeweils eine TNF-homologe Domäne.

1.2 ICOS und ICOS-L

ICOS wurde erstmals auf humanen aktivierten T-Zellen beschrieben (Hutloff et al. 1999). Wie CD28 und CTLA-4 ist ICOS ein glykosyliertes Disulfid-verbundenes Homodimer, dessen zytoplasmatischer Rest ein YMFM Motiv beinhaltet. Dieses Motiv ähnelt dem YMNM Motiv von CD28 und ist in der Lage an die p85 Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) zu binden (Coyle et al. 2000). Die Kostimulation über ICOS kann sogar eine stärkere PI3K Aktivität hervorrufen als CD28 (Parry et al. 2003). ICOS wird auf aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, Effektor und Memory T-Zellen exprimiert (Coyle et al. 2000; Yoshinaga et al. 1999), wobei die Expression durch den T-Zellrezeptor und CD28 bewirkt wird (Beier et al. 2000; Coyle et al. 2000). Die CD28 Kostimulation verstärkt die ICOS Expression (McAdam et al. 2000), was darauf hinweist, dass nicht alle für CD28 beobachteten Phänomene allein auf CD28 zurückzuführen sind. ICOS Ligand (ICOS-L) wird konstitutiv auf B-Zellen und Dendritischen Zellen, sowie etwas schwächer auf T-Zellen exprimiert. Inflammatorische Signale führen jedoch auch zur Expression auf nicht-lymphatischem Gewebe (Sharpe und Freeman 2002). *In vitro* Studien führten zu den

Ergebnissen, dass das Signal über ICOS zur T-Zell Differenzierung, Proliferation und Zytokinproduktion beiträgt (Coyle et al. 2000; Hutloff et al. 1999; McAdam et al. 2000; Yoshinaga et al. 1999). In der Literatur wurde ICOS immer wieder in Verbindung mit der Expression von IL-10, IL-5 und IL-4 gebracht (Dong et al. 2001a; Hutloff et al. 1999; Löhning et al. 2003; Mages et al. 2000; McAdam et al. 2000). Die Beobachtung, dass die Blockade von ICOS während der initialen Stimulation naiver T-Zellen die Th2 Differenzierung hemmt und im Gegenzug die Th1 Differenzierung verstärkt (McAdam et al. 2000), führte zu der Annahme ICOS spiele nur eine Rolle für Th2 Zellen. Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass ICOS sowohl Th2 als auch Th1 Zytokine induzieren kann (Bonhagen et al. 2003; Löhning et al. 2003; Villegas et al. 2002). Die Blockade von ICOS kann die Th2 Effektorantwort einer Atemwegs-Inflammation reduzieren (Gonzalo et al. 2001), die Th1 vermittelte Abstoßung eines Transplantats minimieren (Özkaynak et al. 2001), aber auch die Entwicklung sowohl von Th1 als auch Th2 Antwort während einer Infektion beeinträchtigen (Greenwald et al. 2002; Kopf et al. 2000). Unbestritten ist die Rolle von ICOS für die T-Zell abhängige B-Zellantwort. Studien mit Antagonisten, transgenen und gendefizienten Mäusen zeigten ganz klar, wie wichtig ICOS für die B-Zelldifferenzierung, den Immunglobulin-Klassenwechsel, die Keimzentrumsformation und die Memory B-Zellentwicklung ist (Coyle et al. 2000; Dong et al. 2001b; Hutloff et al. 1999; McAdam et al. 2001; Tafuri et al. 2001). Die humane ICOS Defizienz äußert sich in dem Erscheinungsbild des variablen Immundefektsyndroms (CVID). Obwohl die betroffenen Patienten in der Lage sind T-Zellantworten auszubilden, ist die Entwicklung von naiven und Memory B-Zellen stark gestört (Grimbacher et al. 2003; Salzer et al. 2004). Wiederholte bakterielle Infektionen des Respirations- und Gastrointestinaltraktes sind die Folge. Im murinen System ist es möglich mittels CD40 Kostimulation das Defizit des Isotypen Klassenwechsels und der Keimzentrumsbildung zu überwinden (McAdam et al. 2001). Dies ist ein Hinweis darauf, dass ICOS die T-Zell-B-Zell-Zusammenarbeit mit Hilfe der Beteiligung des CD40CD40L Signalweges fördert. Nicht nur die T-Zellexpression von CD40L sondern auch von CXCR5 steht in engem Zusammenhang mit der Expression von ICOS (Bonhagen et al. 2003). CXCR5, ein Chemokin Rezeptor, wird von einer kleinen T-Zellsubpopulation, den sogenannten Follikulären T-Helferzellen exprimiert, und führt zu deren Migration in den B-Zellfollikel (Schaerli et al. 2000).

1.3 T-Zellsubpopulationen

Abhängig von der Stärke und Qualität des stimulatorischen Signals, welches die naive T-Zelle erhält, entwickelt sie sich zu funktionell verschiedenen T-Zellsubtypen. Jede dieser T-Zellsubpopulationen wird durch spezifische Transkriptionsfaktoren oder Zytokinprofile charakterisiert.

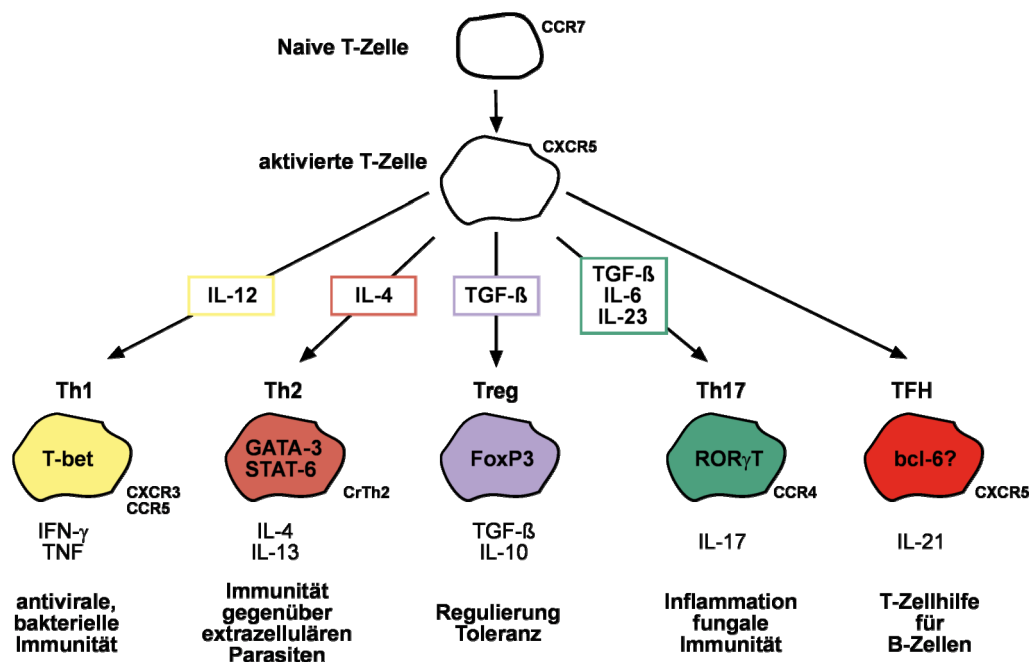


Abb. 2: T-Zellsubpopulationen

Schematische Darstellung der Effektor T-Zelldifferenzierung und der Expression der entsprechenden Transkriptionsfaktoren, Effektorzytokine und Chemokinrezeptoren. Abbildung in Anlehnung an King et al. 2008. Treg – Regulatorische T-Zelle, TFH – Follikuläre T-Helfer Zelle

1.3.1 Effektor und Memory Antwort von T-Zellen

Naive T-Zellen gelangen in die sekundären lymphatischen Organe mittels Rezeptoren wie dem Selektin CD62L und dem CC-Chemokin-Rezeptor-7 (CCR7), die an spezifische Liganden auf Blutgefäßen mit sogenannten hohem Endothel (HEV) binden (Campbell und Butcher 2000). Nach Erkennung ihres spezifischen Peptid-MHCII-Komplexes innerhalb der sekundären lymphatischen Organe kommt es zur klonalen Expansion und zur Differenzierung der T-Zellen (McHeyzer-Williams und Davis 1995). Die Differenzierung erfolgt je nach Stimulus. Th1 Zellen, welche den Transkriptionsfaktor T-bet exprimieren und vorwiegend

IFN- γ sezernieren, induzieren zelluläre Immunantworten und liefern Hilfe für CD8⁺ T-Zellen. Humorale Immunantworten werden durch Th2 Zellen erzeugt, die GATA-3 und bevorzugt IL-4 exprimieren. Proinflammatorische Th17 Zellen exprimieren ROR γ t und sezernieren IL-17A, IL-17F und IL-22 (Dong 2008). Die Th17 Zelldifferenzierung wird durch TGF- β und IL-6 initiiert (Bettelli et al. 2006). Aktivierte CD4⁺ T-Zellen sind außerdem in der Lage, den Peptid-MHCII-Komplex Antigen-spezifischer B-Zellen zu erkennen (Zheng et al. 1996). Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen spielen dagegen eine Schlüsselrolle beim Schutz gegen intrazelluläre Pathogene. Ihre Aktivierung erfolgt durch die Erkennung des Peptid-MHCI-Komplexes und führt zur Deletion viral infizierter Zellen oder Tumorzellen durch Perforin/Granzym-vermittelte Mechanismen. Das Differenzierungsrepertoire der CD8⁺ T-Zelle ist nicht so vielfältig wie das der CD4⁺ T-Zelle, dennoch gibt es einige inflammatorische Zytokine, die die CD8⁺ T-Zelldifferenzierung beeinflussen. IL-12, IFN- γ und IFN $\alpha\beta$ wirken verstärkend auf die klonale Expansion, die Zytotoxizität und die Produktion antiviraler Zytokine (Mescher et al. 2006; Pearce und Shen 2007).

Nachdem das Maximum der klonalen Expansion erreicht wurde, sinkt die Zahl der Effektor T-Zellen drastisch. Der zugrunde liegende Mechanismus wird auch als Aktivierungs-induzierter Zelltod diskutiert und beinhaltet die Expression von FasL, welches die Apoptose anderer Effektor T-Zellen über den Rezeptor Fas auslöst (Hildeman et al. 2002b). Eine weitere Rolle wird dem Überlebensfaktor IL-2 (Hildeman et al. 2002b), den antiapoptotischen Proteinen Bcl-2 und Bcl-xL und den pro-apoptotischen Proteinen Bim und Bax zugesprochen (Hildeman et al. 2002a; Rathmell et al. 2002). Die Effektor T-Zellen, die die Kontraktionsphase überleben und im lymphatischen Gewebe noch Wochen nach der Antigenexposition verbleiben, sind verantwortlich für das immunologische Gedächtnis (Antia et al. 1998). Die Eigenschaften solcher Memory T-Zellen sind niedrige Expressionsniveaus für CD45RB und CD62L, hohe Expressionen des Hyaluronsäurerezeptors CD44 und des Integrins LFA-1, eine erhöhte T-Zellrezeptor Sensitivität und weniger strikte Anforderungen in Bezug auf Kostimulation für die erneute Aktivierung (Dutton et al. 1998). Memory T-Zellen unterscheiden sich von naiven T-Zellen auch durch ihre Verteilung im Gewebe und ihr Zirkulationsmuster. Effektor-Memory T-Zellen (CCR7⁻CD62L^{low}) sind über den ganzen Organismus im peripheren und nicht-lymphatischen Gewebe verteilt und erwerben bei Antigenkontakt eine effiziente Effektorfunktion, aber expandieren nur schwach. *Central-Memory* T-Zellen (CCR7⁺CD62L^{high}) sind dagegen bevorzugt in den sekundären lymphatischen Geweben zu finden, um bei Antigenkontakt durch schnelle Teilung möglichst

viele Effektor T-Zellen zu generieren (Sallusto et al. 2004). Verschiedene Faktoren tragen zur Erhaltung des Memory T-Zellpools bei: eine hohe Telomeraseaktivität für nicht limitierte Proliferation (Hathcock et al. 2003), Überlebenssignale vermittelt über den IL-7 Rezeptor (Kondrack et al. 2003) und/oder die Stimulation der Proliferation über den IL-15 Rezeptor (Berard et al. 2003). Die Zytokine IL-7 und IL-15 bewirken außerdem die Expression anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-2 und Bcl-xL, welche ebenfalls das Überleben der Memory T-Zellen garantieren (Grayson et al. 2000).

1.3.2 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen erhalten die Toleranz, schützen vor Autoimmunität (Sakaguchi et al. 2001) und limitieren chronische Inflammationen wie Asthma (Xystrakis et al. 2006). Bereits vor 38 Jahren wurde die Existenz solcher suppressiver T-Zellen postuliert (Bach et al. 1990; Gershon und Kondo 1970). Aber erst mit der bahnbrechenden Identifikation des für Regulatorische T-Zellen spezifischen Transkriptionsfaktors FoxP3 (forkhead box P3) wurde die Forschung auf diesem Gebiet entscheidend revolutioniert (Hori et al. 2003). Mäuse, die kein funktionelles FoxP3 besitzen, entwickeln eine autoimmun-ähnliche lymphoproliferative Krankheit mit hyperreaktiven CD4⁺ T-Zellen (Brunkow et al. 2001; Fontenot et al. 2003), welche die Bedeutung der Regulatorischen T-Zellen für die periphere Toleranz unterstreicht. Natürlich auftretende FoxP3⁺CD4⁺CD25⁺ T-Zellen entwickeln sich im Thymus und zeigen ein für Selbstantigene spezifisches T-Zellrezeptor Repertoire (Hsieh et al. 2004). T-Zellen mit suppressiven Eigenschaften können aber auch experimentell induziert oder aus Effektor T-Zellen während inflammatorischer Prozesse in peripheren Geweben konvertiert werden (Hawrylowicz und O'Garra 2005). Die Regulatorische T-Zellfunktion wird über unterschiedliche Mechanismen vermittelt. In einigen *in vivo* Modellen erfolgt die Suppressionswirkung eindeutig über Zytokin-abhängige Mechanismen (Li et al. 2007; Maloy et al. 2003). Erst kürzlich wurde IL-35 als ein neues inhibitorisches Zytokin beschrieben, welches bevorzugt von Regulatorischen T-Zellen exprimiert wird (Collison et al. 2007). Regulatorische T-Zellen besitzen aber auch zytolytische Fähigkeiten. Noelle und Kollegen waren die ersten, die zeigten, dass die suppressive Aktivität von Regulatoren in Granzym-B defizienten Mäuse deutlich reduziert ist (Cao et al. 2007; Gondek et al. 2005). Eine weitere lang diskutierte Theorie ist, ob die hohe CD25 Expression die Regulatorische T-Zelle dazu befähigt lokales IL-2 zu „konsumieren“ um dadurch die Teilung der Effektor T-Zellen zu verhindern (Thornton und Shevach 1998). Diese These kann jedoch nicht eindeutig bestätigt

werden, da die IL-2 Depletion allein nicht ausreicht, um Effektor T-Zellen zu inhibieren (Oberle et al. 2007). Zwei neue interessante Ansätze beruhen auf der intra- oder extrazellulären Ausschüttung von Adenosin Nukleosiden (Borsellino et al. 2007; Deaglio et al. 2007; Kobie et al. 2006). Zusätzlich zur direkten Wirkung auf die T-Zellfunktion kann aber auch die Funktion von Dendritischen Zellen über CTLA-4 (Oderup et al. 2006) oder durch die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) beeinflusst werden (Fallarino et al. 2003), da Regulatorische T-Zellen mit Dendritischen Zellen interagieren (Misra et al. 2004). Noch ist nicht klar, wie welche Mechanismen miteinander in Verbindung stehen, um eine maximale suppressive Aktivität zu erzielen. Die Existenz mehrerer Subpopulationen von Regulatorischen T-Zellen läßt im Endeffekt darauf schließen, dass je nach Gewebe und Typ der Immunreaktion unterschiedliche Suppressionsmechanismen zum Einsatz kommen.

1.3.3 Follikuläre T-Helferzellen

Die Keimzentrumsreaktion ist die entscheidende Komponente der T-Zell-abhängigen Antikörperantwort, denn im Keimzentrum treffen T-Zellen und B-Zellen aufeinander. $CD4^+$ T-Zellen spielen sowohl bei der Formation der Keimzentren, der Affinitätsreifung Antigen-spezifischer B-Zellen als auch für die Differenzierung zu Memory B-Zellen oder Plasmazellen eine wichtige Rolle und sind somit entscheidend für die Aufrechterhaltung der Langzeitimmunität (Garside et al. 1998; Liu et al. 1996). Lange Zeit dachte man, dass die B-Zellhilfe durch Th2-Zellen vermittelt wird. Erst mit der Entdeckung des Chemokinrezeptors CXCR5 wurden die wahren Helferzellen, die Follikulären T-Helferzellen (TFH) identifiziert. CXCR5 ist der Rezeptor für CXCL13, welches von follikulären Stroma- und Dendritischen Zellen sezerniert wird, und führt demnach zur Lokalisation der B und T-Zellen in den follikulären Arealen des lymphatischen Gewebes (Cyster et al. 2000; Gunn et al. 1998). Naive T-Zellen sind CXCR5⁻ und nutzen den Chemokinrezeptor CCR7 um in die sekundären lymphatischen Organe und zu den T-Zellzonen zu gelangen. Die Expression von CXCR5 wird erst hochreguliert, wenn die T-Zelle über den MHCII Komplex und kostimulatorische Moleküle aktiviert wurde (Sallusto et al. 1999). Follikuläre T-Helferzellen behalten ihre hohe CXCR5 Expression bei, während polarisierte Th1 und Th2 Zellen diesen Chemokinrezeptor nicht exprimieren (Moser und Ebert 2003). Zusätzlich exprimieren Follikuläre T-Helferzellen in hohem Maße ICOS, das Zytokin IL-21, CD40L und den Transkriptionsfaktor Bcl-6. ICOS wurde bereits im Zusammenhang mit der Generierung von Follikulären T-Helferzellen *in vivo* beschrieben (Akiba et al. 2005). IL-21 reguliert die B-Zellproliferation und den Klassen-

wechsel; die IL-21R Defizienz resultiert in einer defekten Antikörperantwort und beeinträchtigten Keimzentrumsformation (Spolski und Leonard 2008). Der Zusammenhang dieser Moleküle wird besonders in Sanroque Mäusen deutlich, welche erhöhte CXCR5⁺CD4⁺ T-Zellzahlen als Folge eines Defektes der ICOS Degradation besitzen. Diese Mäuse produzieren spontan Autoantikörper und entwickeln eine Lupus-ähnliche Autoimmunität, welche mit einer gesteigerten IL-21 Produktion einhergeht (Vinuesa et al. 2005). Der Rezeptor von IL-21 ist in die Signalwege JAK-STAT, MAPK und PI3K involviert (Zeng et al. 2007) und wird nicht nur von B-Zellen sondern auch von Follikulären T-Helferzellen exprimiert (Chtanova et al. 2004). CD40L bindet an CD40 auf der Oberfläche der B-Zellen und induziert die B-Zellproliferation, den Klassenwechsel und die Differenzierung (Quezada et al. 2004). Die Expression von Bcl-6 ist streng reguliert und auf Keimzentrums B-Zellen und T-Zellen begrenzt (Allman et al. 1996); Th1 und Th2 Zellen exprimieren kein Bcl-6 (Chtanova et al. 2004). Die Bcl-6 Defizienz äußert sich durch defekte T-Zell-abhängige Antikörperantworten und eine gestörte Affinitätsreifung, aufgrund der Unfähigkeit der B-Zellen Keimzentren zu bilden (Ye et al. 1997). Follikuläre T-Helferzellen exprimieren außerdem eine Mehrzahl zusätzlicher negativer Kostimulatoren wie PD-1 oder CTLA-4 (Chtanova et al. 2004; Haynes et al. 2007).

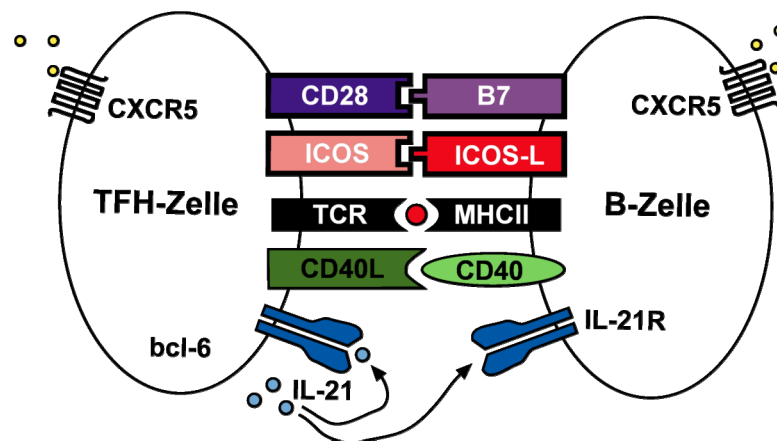


Abb. 3: B-Zellhilfe durch Follikuläre T-Helferzellen

Schematische Darstellung wichtiger Moleküle für die Funktion der Follikulären T-Helferzelle (TFH)
 TZR – T-Zellrezeptor, MHCII – Haupthistokompatibilitätskomplex II

2 Material und Methoden

2.1 Mäuse

ICOS Knock-out (KO) (Özkaynak et al. 2001) und ICOS-L KO Mäuse (Wong et al. 2003) wurden für 10 Generationen auf C57BL/6 und BALB/c zurückgekreuzt. Die KO Mäuse für CD28 (Shahinian et al. 1993) und CD80/86 (Borriello et al. 1997) wurden ebenfalls für mindestens 10 Generationen auf C57BL/6 rückgekreuzt. Als Wildtyp (WT) Kontrolltiere für alle Experimente wurden C57BL/6 bzw. BALB/c ähnlichen Alters verwendet. Ovalbumin (OVA) T-Zellrezeptor (TZR) transgene OT-II (Barnden et al. 1998) und OT-I Mäuse (Hogquist et al. 1994) wurden zusätzlich mit B6.PL Mäusen (Jackson) gekreuzt, um adoptiv transferierte Zellen über den Marker CD90.1 (Thy-1.1) nachverfolgen zu können. Einige Experimente erforderten zudem die Kreuzung von OT-II B6.PL mit ICOS KO Mäusen. Die Zucht und Haltung der Tiere erfolgte unter spezifisch-pathogen-freien Bedingungen im Tierbereich des Bundesinstituts für Risikobewertung, Berlin. Die Experimente wurden gemäß den staatlichen Richtlinien durchgeführt und waren durch die lokale Ethikkommission genehmigt.

2.2 Tierexperimentelle Methoden

2.2.1 Adoptiver Transfer von Zellen

Für alle Antigen-spezifischen Transferexperimente wurden Splenozyten von OVA TZR transgenen OT-II oder OT-I Mäusen isoliert. Für OT-II Zellen erfolgte eine Sortierung auf naive, CD62L^{high} Zellen mittels magnetischer Zellsortierung (MACS). Die Frequenz der T-Zellen mit dem transgenen TZR α 2/TZR β 5-Rezeptor wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Jeweils $2,5 \times 10^6$ CD4⁺Thy-1.1⁺TZR α 2⁺TZR β 5⁺ oder $1,5 \times 10^6$ CD8⁺Thy-1.1⁺TZR α 2⁺TZR β 5⁺ Zellen wurden intravenös in die Rezipiententiere injiziert. Für die abgebildeten Experimente erfolgte der Transfer von OT-I oder OT-II WT Zellen in WT und ICOS-L KO Rezipienten. Alternativ wurden transgene OT-II ICOS KO Splenozyten in WT Rezipienten injiziert. 18-24 h nach dem Transfer der Zellen wurden die Mäuse immunisiert. Zum Studium der homöostatischen Expansion erfolgte die intravenöse Injektion von 25×10^6 Lymphknoten (LN)-Zellen von B6.PL Mäusen in WT und ICOS-L KO Rezipienten.

2.2.2 Immunisierung von Tieren

Je nach Experimentansatz erfolgte die Antigengabe lokal oder systemisch. Im ersten Fall wurden 50 µg Alum-präzipitiertes OVA (haptensiert mit Nitrophenol, um in zukünftigen Experimenten auch eine Antigen-spezifische B-Zell-Antwort untersuchen zu können) und 5×10^7 Hitze-inaktivierte *Bordetella pertussis* (Chiron Behring) als Adjuvanz subkutan in die Fußsohle oder den Schwanzansatz injiziert. Die jeweiligen drainierenden LN sind die poplitealen bzw. inguinalen LN. Die systemische Immunisierung erfolgte mit 2 mg Endotoxin-freiem OVA (weniger als 5 pg Endotoxin pro mg Protein gemäß LAL Assay) in die Schwanzvene der Tiere.

2.2.3 *In vivo*-Blockade mit Antikörpern

Die Unterbrechung von Rezeptor-Ligand-Interaktionen erfolgte durch mehrfache intra-peritoneale Injektion der entsprechenden blockierenden Antikörper. Blockiert wurde mit 150 µg anti-ICOS-L (MIL-5733, eigener Antikörper) oder 80 µg (100 µg, 50 µg) anti-PD-1 (RMPI-14, eBioscience) alle zwei Tage oder nur zu späten Zeitpunkten. Die Kontrollgruppen erhielten entsprechend jeweils 150 µg polyklonales Ratten Immunglobulin (Nordic).

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung muriner Zellen

Die Gewinnung von Zellen aus Milzen, LN oder Thymi erfolgte durch Zerkleinern der Organe und nachfolgendes Passieren durch ein 212 µm bzw. 70 µm Sieb. Zellen aus der Milz wurden zusätzlich einer 1-minütigen Erythrozytenlyse mit ACK-Puffer (0,15 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 0,1 mM Na_2EDTA) unterzogen. Zur Analyse der Lymphozyten im Blut erfolgte eine retroorbitale Blutentnahme. Die 5-minütige Erythrozytenlyse des Blut/Heparin-gemisches wurde erst nach der Oberflächenfärbung (siehe 2.3.2.1) durchgeführt. Zur Zellzählung wurde das Zellzählgerät Guava®PCA (Guava Technologies) genutzt. Die Messung der mit Viacount Reagenz (2,5 µg/ml LDS-751, 1 µg/ml Propidiumiodid, 5 mM EDTA, 0,05% NaN_3 , in PBS, pH 7,2) verdünnten Zellen erfolgte nach 3 min und die Ermittlung der Anzahl nukleärer und lebender Zellen mit der ViaCount Software (Guava Technologies).

2.3.2 Durchflusszytometrie

2.3.2.1 Färbung der Zelloberfläche

Zur Analyse der Proteinexpression auf Einzelzellebene wurden 1×10^6 – 4×10^6 Zellen in 96-Well-Rundbodenplatten (Nunc) gefärbt. Um unspezifische Antikörperbindungen an Fc-Rezeptoren zu minimieren, erfolgte eine 5-minütige Inkubation mit Fc-Block (100 µg/ml anti-CD16/CD32 (Klon 2.4G2), 50 µg/ml Ratten IgG (Nordic)). Die Inkubation mit den in FACS-PBS (PBS + 2,5% FCS + 0,1% NaN₃) verdünnten fluoreszenzmarkierten Antikörpern (Ak) auf Eis dauerte 20 min. Alternativ zu direkt gekoppelten Ak wurden Biotin- oder Digoxigenin-markierte Primärantikörper mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-gekoppeltem Streptavidin- bzw. anti-Digoxigenin (Roche) gefärbt. Um die Spezifität der Antikörperbindung zu kontrollieren, wurde in einigen Experimenten zuvor mit einem 100-fachen Überschuss des nicht fluoreszenzmarkierten Ak das zu bindende Epitop blockiert (kalte Blockade). Vor Einsatz eines jeden Ak wurde dieser titriert, um optimale Färbeergebnisse zu erhalten. Die Verwendung von 4',6'-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, 0,33 µM, Roche) ermöglichte den Ausschluss toter Zellen aus der Analyse. Die Analyse wurde mit einem BD™ LSRII Durchflusszytometer (BD Biosciences) unter Verwendung der Software BD FACSDiva (BD Biosciences) vorgenommen. Zur Auswertung der Daten wurde die Software FlowJo (Tree Star Inc.) verwendet. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Histogramm oder *Dot Plot*, wobei die Zahlen jeweils den prozentualen Anteil bezogen auf das vorherige oder das in eckigen Klammern vermerkte Gate angeben.

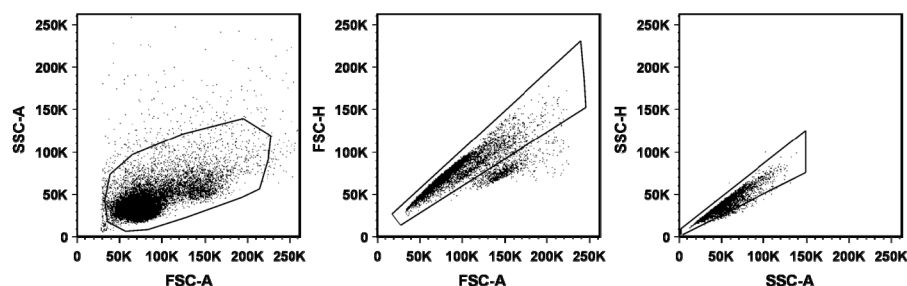


Abb. 4: Durchflusszytometrische Analyse

Darstellung der durchflusszytometrisch gemessenen Zellen im Vorwärts- und Seitwärtsscatter. Für die Analyse wurde ein Scattergate verwendet, welches die aktivierten T-Zellen beinhaltete. Zusätzlich erfolgte der Ausschluss von Dupletten und DAPI⁺ Zellen. Die gezeigte Auswertestrategie wurde für alle durchflusszytometrischen Analysen verwendet und wird im Folgenden nicht mehr dargestellt.

Für alle Experimente erfolgte standardmäßig die Verwendung eines geeigneten Scattergates und der Ausschluss von Dupletten und DAPI⁺ Zellen (Abb. 4).

2.3.2.2 Intrazelluläre Färbung

Zur Färbung intrazellulärer Proteine wurden die Zellen fixiert und nachfolgend die Zellmembranen permeabilisiert. Die Fixierung erfolgte mit 2%igem Formaldehyd in PBS (20 min, RT) oder mit einem kommerziell erhältlichen Fixierungspuffer (Cytokine Buffer Set, eBioscience). Danach wurden die Zellen mit FACS-PBS gewaschen und bei 4°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert. Für die Färbeprozedur erfolgten alle weiteren Wasch- und Inkubationsschritte in Saponinpuffer (FACS-PBS + 0,5% Saponin (Sigma)) oder dem entsprechenden kommerziellen Permeabilisierungspuffer (eBioscience). Für die Färbung von FoxP3 wurde das FoxP3 Staining Buffer Set (eBioscience) verwendet. Die Oberflächenfärbungen und die Färbung auf tote Zellen mit dem Live/Dead® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Invitrogen) erfolgten generell vor der Fixierung.

2.3.2.3 Verwendete Antikörper

Tab. 1: Verwendete Antikörper

Auflistung aller verwendeten Antikörper (Ak). Die nicht kommerziell bezogenen Ak stammen aus laboreigenem Hybridomüberstand und wurden an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt.

Antigen	Klon	Quelle	Referenz/Hersteller
aktive Caspase-3	C92-605	kommerziell	BD Biosciences
Bcl-2	3F11	kommerziell	BD Biosciences
Bcl-xL	54H6	kommerziell	Cell Signaling
B Lin neg	CD3 + CD8 + Ly-6G/C		
BrdU	B44	kommerziell	BD-Biosciences
CD3	KT3	Hybridom	(Tomonari 1988)
CD4	GK1.5	Hybridom	ATCC: TIB 207
CD4	YTS 191.1	Hybridom	ECACC:87072282
CD8	53-6.72	Hybridom	ATCC: TIB 105
CD11c	N418	Hybridom	ATCC: HB-224
CD19	1D3	Hybridom	ATCC: HB-305
CD21	7G6	kommerziell	BD Biosciences

CD23	B3B4	kommerziell	eBioscience
CD25	2E4	Hybridom	(Ortega et al. 1984)
CD28	37.51	Hybridom	(Gross et al. 1992)
CD44	IM7.8.1	Hybridom	ATCC: TIB 235
CD45R (B220)	RA3-6B2	Hybridom	(Allman et al. 1992)
CD62L	MEL-14	Hybridom	ATCC: HB-132
CD69	H1.2F3	kommerziell	eBioscience
CD90.1 (Thy-1.1)	OX-7	Hybridom	ECACC: 84112008
CD93	AA4.1	kommerziell	eBioscience
CD95 (Fas)	15A7	kommerziell	eBioscience
CD127 (IL-7R)	A7R34	kommerziell	eBioscience
CD134 (OX-40)	OX-86	Hybridom	ECACC: 96110601
CD137 (4-1BB)	17B5	kommerziell	eBioscience
CD152 (CTLA-4)	UC10-4F10-11	Hybridom	ATCC: HB-304
CD154 (CD40L)	MR-1	Hybridom	ATCC: HB-11048
CD185 (CXCR5)	2G8	kommerziell	BD Biosciences
CD275 (ICOS-L)	MIL-5733	Hybridom	Eigener Antikörper
CD278 (ICOS)	MIC280	Hybridom	(Löhning et al. 2003)
CD278 (ICOS)	MIC2043	Hybridom	(Burmeister et al. 2008)
CD279 (PD-1)	J43 oder RMP1-30	kommerziell	eBioscience
CD317 (PDCA-1)	eBio927	kommerziell	eBioscience
FoxP3	FJK-16s	kommerziell	eBioscience
GITR	DTA-1	kommerziell	eBioscience
IFN- γ	AN18.17.24	Hybridom	(Prat et al. 1984)
IgD	11-26c	Hybridom	ATCC: HB-250
IgM	Bet-2	Hybridom	ATCC: HB-88
IL-2	JES6-5H4	Hybridom	(Abrams et al. 1992)
IL-4	11B11	Hybridom	ATCC: HB-188
IL-10	JES5-2A5	Hybridom	(Sander et al. 1993)
Ly-6G/C	RB6-8C5	Hybridom	(Hestdal et al. 1991)
MHCII	M5/114.15.2	Hybridom	ATCC: TIB 120
V α 2-TCR	B20.1	kommerziell	eBioscience
V β 5-TCR	MR9-4	kommerziell	BD Biosciences

2.3.2.4 Genutzte Fluorophore und ihre Emissionsspektren

Tab. 2: Genutzte Fluorophore und ihre Emissionsspektren

Angegeben sind die verwendeten Fluorophore, die Anregungs- und Emissionswellenlängen sowie die im BD™ LSRII eingesetzten Bandpassfilter (BP Filter) für die Fluoreszenzdetektoren. A – Alexa Fluor (Invitrogen).

Fluorophor	Anregungswellenlänge	Emissionsmaximum	BP Filter
FITC, CFSE	488 nm	525 nm	530/30
PE	488 nm	575 nm	585/42
PerCP	488 nm	675 nm	685/40
PE-Cy5.5, 7-AAD	488 nm	695/655 nm	685/40
PE-Cy7	488 nm	767 nm	780/60
A647/Cy5/APC	633 nm	665/667/660 nm	670/14
A700	633 nm	723 nm	720/30
APC-Cy7	633 nm	767 nm	780/60
Pacific Blue, DAPI	405 nm	451 nm	440/40
Cascade Yellow, DAPI	405 nm	558 nm	562/40
Pacific Orange	405 nm	551 nm	562/40

2.3.3 Magnetische Sortierung von murinen Zellen

Durch spezifische Markierung einer Zellpopulation mit Antikörper-gekoppelten magnetischen Partikeln (*Beads*) kann diese mit Hilfe magnetisierbarer Säulen (Miltenyi Biotec) aus einer komplexen Zellsuspension heraussortiert werden. Für die Sortierung naiver T-Zellen wurde die Zellsuspension (200×10^6 Zellen/ml in MACS-PBS (PBS + 2 mM EDTA + 0,5% BSA)) 15 min lang mit einer limitierten Konzentration von anti-CD62L-*Beads* (Miltenyi Biotec) inkubiert. Die vorherige Inkubation mit Fc-Block (100 µg/ml anti-CD16/CD32 (Klon 2.4G2), 50 µg/ml Ratten IgG (Nordic)) verhinderte eine unspezifische Bindung des Ak. Die markierten Zellen blieben im magnetischen Feld auf der Säule haften. Nach mehrmaligen Waschen mit MACS-PBS zur Reduktion von unspezifisch gebundenen Zellen, konnte die in der Säule verbliebene Zellpopulation durch Entfernen des magnetischen Feldes eluiert werden. Die Reinheit der positiv sortierten Population und des Durchflusses wurden am Durchflusszytometer überprüft.

2.3.4 Sortierung von Zellen mittels Durchflusszytometrie

Bei der Sortierung kleiner Zellpopulationen mittels MACS stößt man an Grenzen bezüglich der Reinheit der Zellen und der Anzahl an sortierbaren Oberflächenmarkern. Die durchflusszytometrische Sortierung an einem BD FACS Aria™ Hochgeschwindigkeits-Zellsortiersystem (BD Biosciences) ermöglicht dagegen die Isolierung kleinster Subpopulationen (1–2%) mit sehr hoher Reinheit. Zur Sortierung der transgenen OT-II Zellen wurde die Zellsuspension (50×10^6 Zellen/ml in MACS-PBS) mit folgenden Ak gefärbt: anti-TCRV α 2-FITC, anti-CD4-PE oder -A700, anti-Thy-1.1-APC oder -Bio/Strep-PE-Cy7 und anti-B220-Pacific Blue (siehe Tab. 1). Zur Detektion toter Zellen wurde DAPI zugesetzt. Eine vorherige Anreicherung der Zielzellen erfolgte mittels MACS oder einer Vorsortierung am FACS Aria im *Yield*-Modus. Die benutzten Laser und Filtersysteme ähneln denen des BD™ LSR II und das verwendete Gerät befand sich zum Zeitpunkt der Nutzung am Deutschen Rheumaforschungszentrum, Berlin.

2.3.5 Zellproliferations- und Zellzyklus-Assays

Mit Hilfe von 5, 6-Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFSE, Invitrogen), einem fluoreszierenden Farbstoff, welcher Zellmembranen leicht durchdringen kann, wurden die zu transferierenden Zellen markiert. Innerhalb der Zelle werden die lipophilen Gruppen des CFSE-Moleküls von unspezifischen Esterasen abgespalten. Der entstandene 5, 6-Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester kann die Zelle nun nur noch sehr langsam verlassen und wird bei der Zellteilung zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben. Die Färbung der Zellen erfolgte in einer 5 μ M CFSE-Lösung (5×10^7 Zellen/ml in PBS + 0,1% BSA) für 10 min bei 37°C. Die Analyse erfolgte am BD LSR II Durchflusszytometer. Durch die kontinuierliche Abnahme des CFSE-Signals können bis zu 7 Proliferationszyklen im Detail nachvollzogen werden. Um die Proliferation über einen sehr kurzen Zeitraum zu analysieren, wurde 2 h vor Präparation der LN 1 mg des Thymidinanalogs Bromodesoxyuridin (BrdU) i.v. gespritzt. Die Fixierung, Permeabilisierung und Färbung mit APC-konjugiertem anti-BrdU erfolgte mit einem kommerziellen BD Pharmingen™ BrdU Flow Kit (BD Biosciences) gemäß den Herstellerangaben. Eine zusätzliche Färbung der Zellen mit dem Kernfarbstoff 7-Aminoactinomycin (7-AAD, BD Biosciences) ermöglichte die Analyse des Zellzyklus und somit die spezifische Untersuchung der G_{0/1}-, S- und G₂-Phase.

2.3.6 Apoptose-Assays

Früh-apoptotische Zellen tragen das Molekül Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche, lassen sich aber noch nicht mit DAPI anfärben (Vermes et al. 1995). Daher können sie durch Anfärben mit Annexin V unter Ausschluss DAPI-positiver Zellen detektiert werden. Aufgrund der Ca^{2+} -Abhängigkeit der Bindung wurde die Inkubation mit Annexin V-Cy5 oder -PE (BD Biosciences bzw. Invitrogen) nach der Oberflächenfärbung in 10 mM Hepes pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2 und 0,01% NaN_3 bei RT vorgenommen. Die DAPI^{low} $\text{Annexin}^{\text{high}}$ Zellen wurden in die Analyse miteinbezogen. Während des Apoptoseprozesses spielen aktive Caspasen die zentrale Rolle. Eine Alternative zu Annexin V ist daher die Markierung mit Zellmembran-durchlässigen, nichttoxischen fluoreszierenden Caspaseinhibitoren. Der Fluorophor-gekoppelte Caspaseinhibitor (FLICA) FAM-VAD-FMK bindet an die Caspasen-1 und 3-9. Die Inkubation mit diesem erfolgte für 1 h bei 37°C gemäß den Herstellerangaben (FLICA Apoptosis Detection Kit Caspase Assay, Immunochemistry Technologies). Als dritte Alternative wurde die aktive Caspase-3 mit einem monoklonalen Ak (BD Biosciences) intrazellulär angefärbt.

2.3.7 *In vitro*-Restimulation von Zellen

Zur Analyse von Zytokinen wurden Splenozyten oder LN-Zellen (2×10^6 Zellen/ml) für 4,5 h im Brutschrank mit Phorbol-Myristat-Acetat (PMA, 10 ng/ml) und Ionomycin (10 µg/ml) (Sigma-Aldrich) aktiviert. Das verwendete Medium war: RPMI1640 mit 10% FCS, versetzt mit 2 mM Glutamin, 1×Penicillin/Streptomycin, 1 mM Natrium-Pyruvat, 1×nicht-essentiellen Aminosäuren und 50 µM β -Mercaptoethanol. Für die intrazelluläre Zytokinfärbung erfolgte nach 1 h die Zugabe von Brefeldin A (Sigma-Aldrich). Alternativ wurden OVA-spezifische Lymphozyten (OT-II) für 4,5 h mit 10 µg/ml OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid (P. Henklein, Charité) stimuliert.

2.3.8 Zytokin Sekretions Assay

Die Messung der Zytokinproduktion ohne Restimulation wurde mit einem Zytokin Sekretions Assay (Cytokine Secretion Assay, Miltenyi Biotec) durchgeführt. Für die Analyse transferierter Antigen-spezifischer T-Zellen erfolgte die Präparation der drainierenden LN 6, 14, 24 oder 48 h nach Immunisierung. Die LN nicht immunisierter Tiere wurden direkt

entnommen. Für den Zytokinnachweis erfolgte zunächst die 5-minütige Inkubation der Zellen mit Zytokin-spezifischem *Catch Reagent*, welches auf der Zelloberfläche aller Lymphozyten bindet. Wurde in der nachfolgenden 45 minütigen Inkubationszeit bei 37°C das nachzuweisende Zytokin sezerniert, erfolgte die Bindung an das *Catch Reagent*. Sezerniertes Zytokin konnte mittels fluoreszenz-markiertem Ak gegen das Zytokin nachgewiesen werden. Der Assay wurde für IL-2, IFN- γ , IL-10 und IL-4 durchgeführt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Präparation von RNA und cDNA-Synthese

Für die Isolierung von RNA wurden bis zu 4×10^6 Zellen in 200 μ l DEPC-PBS resuspendiert und mit 400 μ l Lysepuffer (Roche) versetzt. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Proben in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt. Die Präparation der RNA erfolgte nach Herstellerangaben mit dem High Pure RNA Isolation Kit (Roche) unter Verwendung von RNase-freien Spitzen und Eppendorfgefäßen. Die Konzentration wurde mit einem Nanodrop ND-1000 Spektrometer (PepLab) ermittelt und die Messung der RNA-Integrität wurde an einem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) vorgenommen. Verwendete Reagenzien stammten aus dem RNA 6000 Nano oder Pico Kit (Agilent Technologies). Ausgewertet wurde mit der Software 2100 Expert (Agilent Technologies). Mit Hilfe des ABI HighCapacity cDNA RT Kit (Applied Biosystems) wurde die RNA in einer 20 μ l Reaktion in einem ABI Mastercycler Gradient Thermocycler (Applied Biosystems) in cDNA umgeschrieben (10 min 25°C, 120 min 37°C, 5s 85°C).

2.4.2 Durchführung von TaqMan-Arrays

Für die Expressionsanalyse mit Hilfe von TaqMan Low Density Arrays (Applied Biosystems) wurde cDNA aus jeweils 1 μ g RNA gemäß Herstellerangaben verwendet. Die Messung erfolgte mit einem 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, 10 min 95°C, 15 s 95°C für 40 Zyklen, 1 min 60°C). Die Analyse wurde mit SDS Software v2.1 (Applied Biosystems) vorgenommen. Für das RT² Profiler™ PCR Array Mouse Apoptosis-System (SuperArray) wurde ebenfalls die cDNA aus 1 μ g RNA gemäß Herstellerangaben eingesetzt. Die Messung erfolgte mit einem 7900HT Fast Real-Time PCR System mit folgendem

Programm: 10 min 95°C, 15 s 95°C für 40 Zyklen, 1 min 60°C. Zur Auswertung der Arrays wurden die erhaltenen c_t Werte auf 18s RNA oder Haushaltsgene normalisiert. Die Berechnung der n-fachen Regulation erfolgte durch Dividieren der normalisierten Expression des Genes von Interesse durch das der Kontrolle. Die mathematische Grundlage für die

Berechnung bietet folgende Formel:
$$\frac{2^{-\Delta C_t} ICOSL KO}{2^{-\Delta C_t} WT} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

2.5 Statistische Analysen

Alle statistischen Analysen erfolgten mit Prism Software (GraphPad Software Inc.). In den dargestellten Graphen stellt jedes Symbol ein Tier dar. Angegeben ist der Median für alle zugehörigen Tiere einer Gruppe und die Signifikanz im Falle eines Unterschiedes. Zur Berechnung der p-Werte wurde der Mann-Whitney U Test angewendet. Die Qualität der Signifikanz ist durch * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 ICOS hat keinen Einfluss auf die Zahl der T- und B-Lymphozyten sowie Dendritischen Zellen

Die Untersuchung von ICOS Knock-out (KO) Mäusen im Infektionsmodell haben deutlich gemacht, dass ICOS im Rahmen einer Immunantwort während der T-Zell/B-Zell-Interaktion und der Interaktion von Dendritischen Zellen mit T-Zellen als wichtiger Kostimulator agiert (Greenwald et al. 2005). Insofern stellt sich die Frage, in welchem Maße sich eine fehlende ICOS-Expression auch ohne eine akute Immunreaktion auf das murine Immunsystem auswirken kann. Eine eingehende Analyse von Milz und Lymphknoten (LN) ICOS defizienter Mäuse zeigte, dass das Fehlen von ICOS nicht zu einer groben Beeinträchtigung der wichtigsten Lymphozytenpopulationen im stationären Zustand führt. Die Abbildung 5 zeigt einen Vergleich von ICOS KO Tieren mit entsprechenden Wildtyp (WT) Kontrolltieren. Sowohl die absolute Zellzahl als auch die Frequenz von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, Follikulären und Marginalzonen B-Zellen sowie plasmazytoiden und konventionellen Dendritischen Zellen wiesen keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 5 und Daten nicht gezeigt). Da ICOS-L der einzige Interaktionspartner von ICOS ist, sollte der Knock-out des Liganden den gleichen Phänotyp herbeiführen. Auch diese Tiere waren bezüglich der Untersuchungskriterien nicht von einem WT Tier zu unterscheiden (Daten nicht gezeigt).

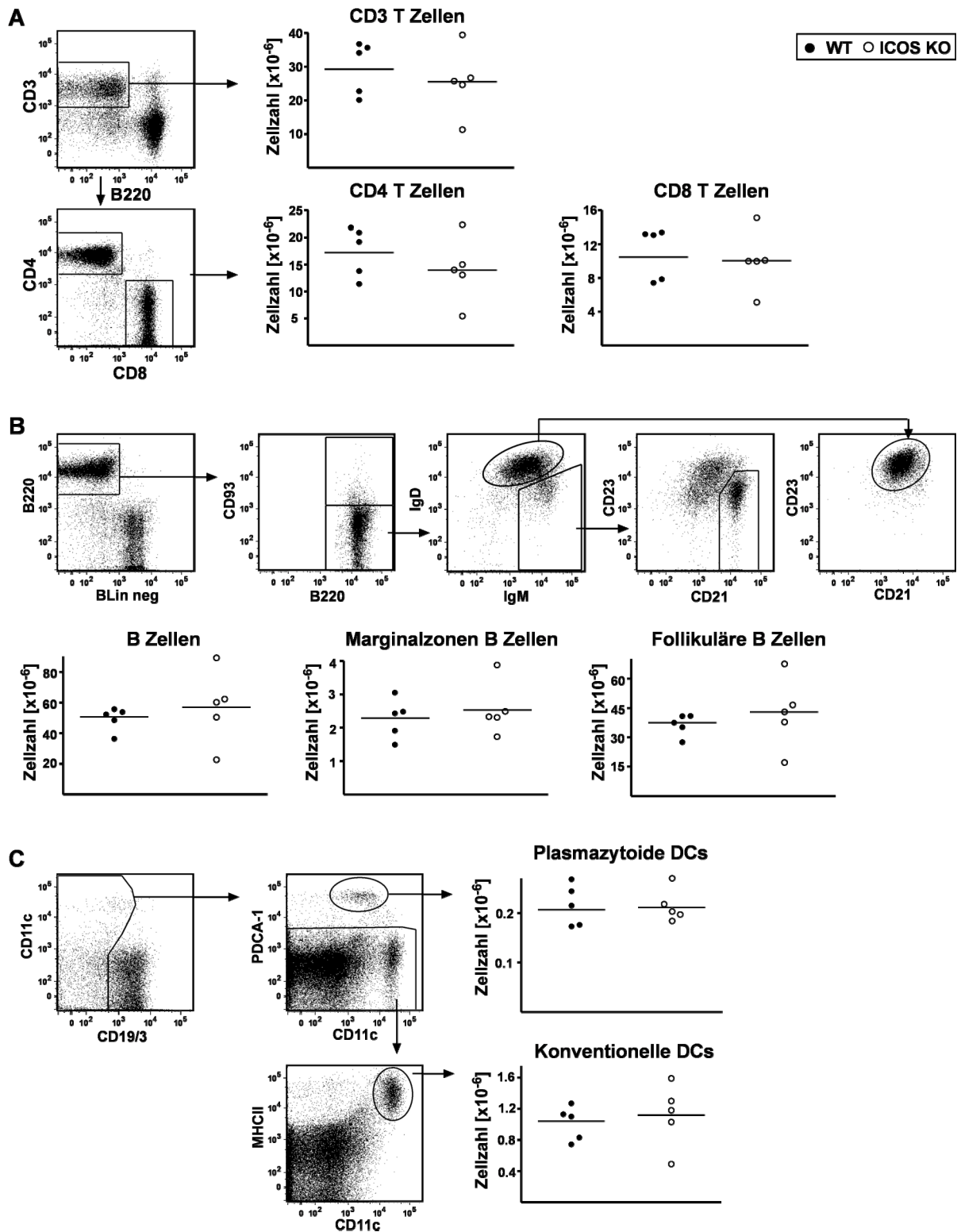


Abb. 5: Untersuchung von ICOS KO Mäusen auf T-, B- und Dendritische Zellen

Die Milzen von C57BL/6 WT und ICOS KO Mäusen wurden auf die Zusammensetzung hinsichtlich ihrer Leukozyten-Subpopulationen durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind die jeweiligen Gatingstrategien für T und B-Zellen sowie Dendritische Zellen. A) Die mittels anti-CD3 identifizierten T-Zellen, wurden zusätzlich in CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen unterteilt. B) Die Gesamtpopulation der B-Zellen wurde als

B220⁺CD3⁻CD8⁻Ly-6G/C⁻ definiert. Mature B220⁺CD93⁻ B-Zellen wurden weiterhin in Marginalzonen (IgD^{low}IgM^{high}CD21^{high}CD23⁻) und Follikuläre (IgD^{high}IgM^{high}CD21^{int}CD23⁺) B-Zellen unterteilt. C) Die Dendritischen Zellen wurden in plasmazytoide (PDCA-1⁺CD11c^{low}) und konventionelle (PDCA-1⁻CD11c^{high}MHCII^{high}) Dendritische Zellen unterteilt. Die zugehörigen Analysen zeigen die Zellzahl der jeweiligen Population pro Milz. Identische Ergebnisse wurden für LN Zellen sowie für ICOS-L KO Mäuse erzielt (Daten nicht gezeigt).

3.2 Effektor-Memory und Regulatorische T-Zellen stellen charakteristische ICOS^{high} Expressoren dar

WT Tiere, bei denen keine Immunisierung vorgenommen wurde, besitzen eine ca. 5%ige Population an CD4⁺ T-Zellen, die ICOS auf sehr hohem Niveau exprimieren (Abb. 6). Dagegen zeigen die restlichen 95% der CD4⁺ T-Zellen lediglich eine basale Expression, die zudem nur mit hochaffinen Antikörpern sichtbar gemacht werden kann.

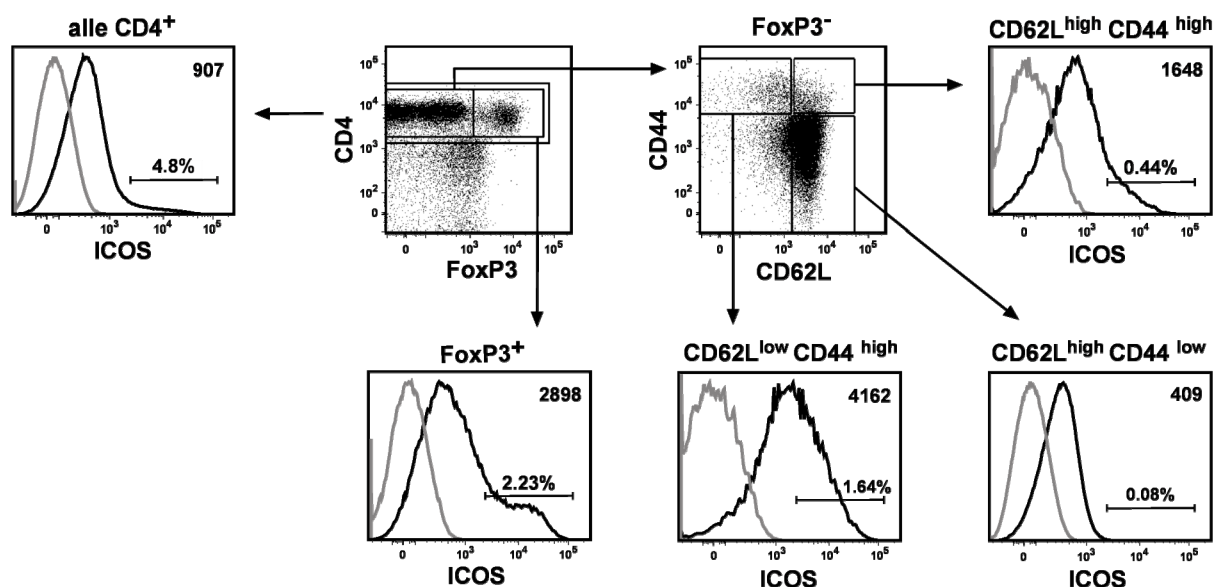


Abb. 6: Charakterisierung der ICOS-Expression auf T-Zellsubpopulationen

Verschiedene CD4⁺ T-Zellsubpopulationen aus peripheren LN wurden in der Durchflusszytometrie auf ICOS Expression untersucht. Die *Dot Plots* zeigen die Gatingstrategie ausgehend von DAPI⁻B220⁻ Zellen, um verschiedene T-Zellsubpopulationen zu definieren: Regulatorische T-Zellen (FoxP3⁺), Effektor-Memory T-Zellen (FoxP3⁻CD62L^{low}CD44^{high}), *Central-Memory* T-Zellen (FoxP3⁻CD62L^{high}CD44^{high}) und naive T-Zellen (FoxP3⁻CD62L^{high}CD44^{low}). Die schwarzen Histogramme zeigen die ICOS-Expression auf den so definierten Subpopulationen. ICOS KO Mäuse (graues Histogramm) dienten als Spezifitätskontrolle. In jedem Diagramm ist die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) des Signals angegeben. Um die Verteilung der 4,8% ICOS^{high}

Zellen innerhalb der T-Zellpopulationen zu verdeutlichen, ist diese Frequenz für jede Subpopulation angegeben (bezogen auf alle $CD4^+$ T-Zellen). Identische Ergebnisse wurden mit LN-Zellen von BALB/c Mäusen erhalten.

Unter Verwendung von Zelloberflächenmarkern zur Definition bestimmter T-Zellsubpopulationen wurde untersucht, welche Zellen eine besonders hohe ICOS Expression aufweisen. Regulatorische T-Zellen, die mittels FoxP3 detektiert wurden, exprimieren fast alle ICOS. Die stärkste ICOS-Expression ist dabei auf $FoxP3^+CD44^{high}$ -Zellen zu finden (Daten nicht gezeigt). Mit Hilfe der Marker CD62L und CD44, war es möglich die FoxP3-negativen Zellen weiterhin in Effektor-Memory-Zellen ($CD62L^{low}CD44^{high}$) sowie *Central-Memory* T-Zellen ($CD62L^{high}CD44^{high}$) zu unterteilen (Sprent und Surh 2002). $CD62L^{low}CD44^{high}$ Zellen besitzen eine ausgeprägt starke ICOS-Expression, wohingegen $CD62L^{high}CD44^{high}$ T-Zellen ICOS auf mittlerem Niveau exprimieren. Naive T-Zellen ($CD62L^{high}CD44^{low}$) sind $ICOS^{low}$. Eine sehr hohe ICOS-Expression ist demzufolge auf Effektor-Memory und Regulatorische T-Zellen begrenzt. Bemerkenswert ist die weitgehend uniforme Expression von ICOS innerhalb dieser Populationen im Gegensatz zu anderen Aktivierungs-induzierten Kostimulatoren wie OX-40, 4-1BB oder CD30, die nur auf Memory T-Zellsubpopulationen nachzuweisen sind (Daten nicht gezeigt).

3.3 ICOS KO Mäuse besitzen weniger Effektor-Memory und Regulatorische T-Zellen

Aufgrund der für Effektor-Memory als auch für Regulatorische T-Zellen nachgewiesenen ausgeprägten ICOS-Expression, stellt sich die Frage nach der funktionellen Bedeutung dieser für die beiden Subpopulationen. Im Zuge dessen wurden die $CD4^+$ T-Zellsubpopulationen von ICOS KO und ICOS-L KO Mäusen intensiv untersucht. Die Abwesenheit eines Partners des ICOS-ICOS-L Rezeptor-Liganden Paares führt zu einer substanziellen Reduktion der Frequenzen und der absoluten Zellzahlen dieser beiden Subpopulationen (Abb. 7 und Daten nicht gezeigt). Eine 12-Wochen alte KO Maus besitzt im Durchschnitt mindestens 30% weniger Effektor-Memory und Regulatorische T-Zellen. Je älter die Maus und desto mehr Effektor-Memory T-Zellen in den lymphatischen Organen zirkulieren, desto deutlicher wird dieser Effekt (Daten nicht gezeigt). Die fehlenden Zellen dieser beiden $CD4^+$ T-Zellsubpopulationen werden durch eine vermehrte Anwesenheit von naiven $CD4^+$ T-Zellen ausgeglichen.

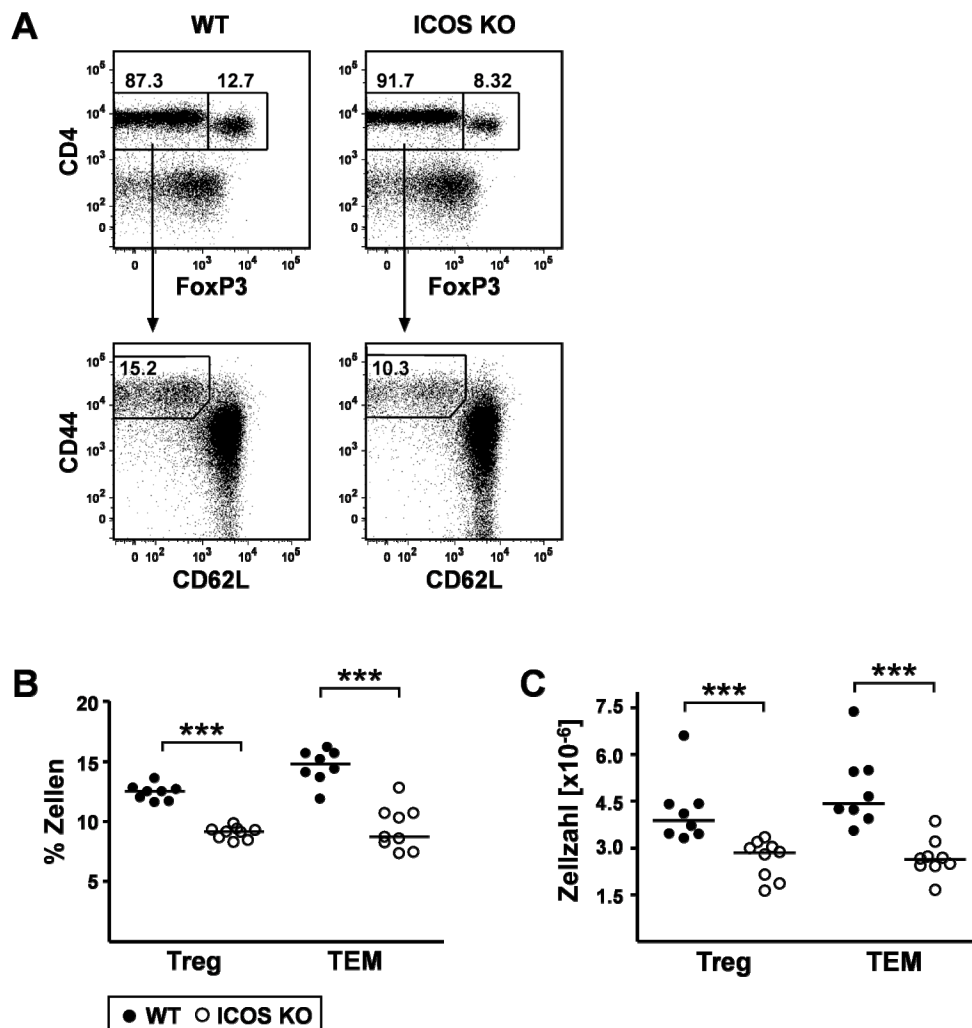


Abb. 7: Regulatorische und Effektor-Memory T-Zellen in ICOS KO Mäusen

Die Milzen von WT und ICOS KO Mäusen (12 Wochen alt) wurden auf die Frequenzen und absoluten Zellzahlen von Regulatorischen (Treg, FoxP3⁺) und Effektor-Memory T-Zellen (TEM, CD44^{high}CD62L^{low}) durchflusszytometrisch untersucht. A) Repräsentative Färbung, welche die Gatingstrategie der T-Zellsubpopulationen ausgehend von DAPI⁺B220⁻ Zellen zeigt. Die Zahlen geben die Frequenz der jeweiligen Subpopulation bezogen auf alle CD3⁺CD4⁺ T-Zellen an. B) Frequenzen der Regulatorischen T-Zellen und Effektor-Memory T-Zellen innerhalb der CD4⁺ T-Zellpopulation und C) absolute Zellzahlen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt vier. Vergleichbare Daten wurden auch mit LN Zellen, ICOS KO Mäusen auf einem BALB/c Hintergrund und ICOS-L KO Mäusen (B6) erzielt (Daten nicht gezeigt).

3.4 Die *de-novo* Generierung von Regulatorischen T-Zellen im Thymus wird von ICOS nicht beeinflusst

Die verringerte Anzahl an Regulatorischen T-Zellen, die in den beiden lymphatischen Organen Milz und Lymphknoten festgestellt werden konnte, kann einerseits auf eine verminderte Generierung im Thymus jedoch auch auf Störungen der Homöostase zurückzuführen sein. Um ersteres grundlegend auszuschließen wurden die Thymi von ICOS KO Mäusen analysiert (Abb. 8). Wie bereits in der Literatur beschrieben, sind weder Veränderungen bezüglich der Größe und Form des Organs nachzuweisen noch anormales Differenzierungsverhalten der Thymozyten (Daten nicht gezeigt und Dong et al. 2001a; McAdam et al. 2001). Die $CD4^+CD8^-$ Population enthielt in den WT wie auch in den ICOS KO Tieren um die 5% FoxP3⁺ Zellen. Innerhalb der $CD4^+CD8^+$ Population wurden in beiden Versuchsgruppen weniger Regulatorische T-Zellen gefunden.

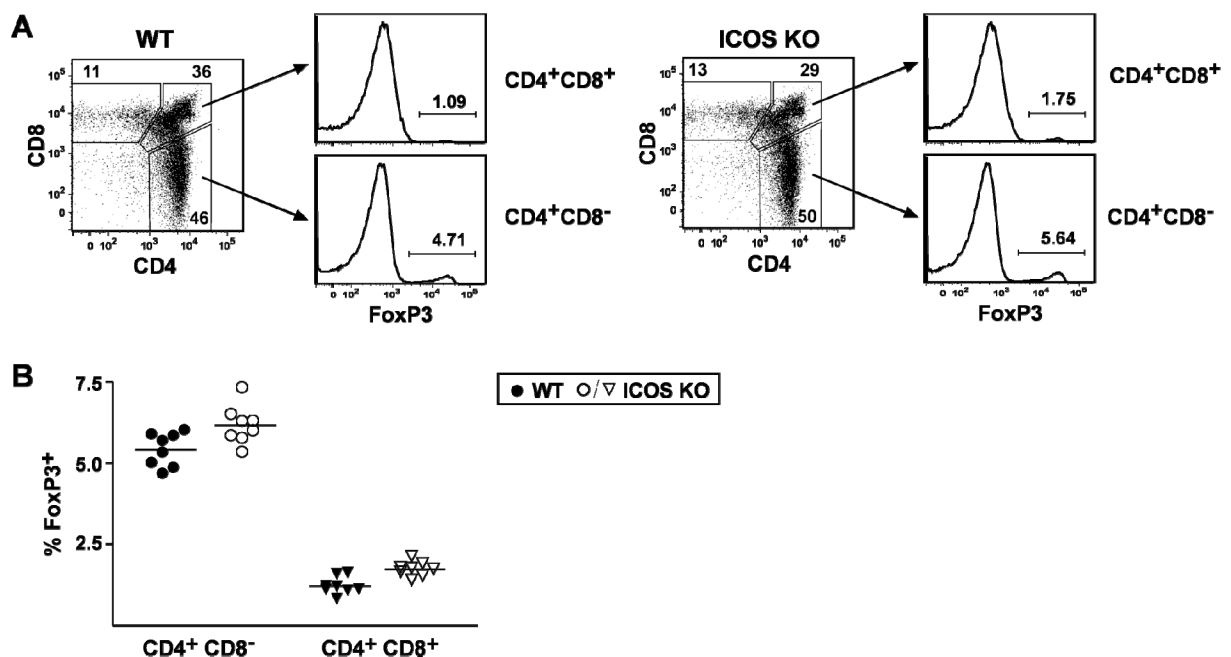


Abb. 8: Regulatorische T-Zellen im Thymus von ICOS KO Mäusen

Analyse der Thymozyten von WT und ICOS KO Mäusen auf FoxP3⁺ Zellen mittels Durchflusszytometrie. A) $CD3^+$ T-Zellen wurden unterteilt in $CD4^+CD8^-$, $CD4^-CD8^+$ und $CD4^+CD8^+$ T-Zellen. Gezeigt ist eine repräsentative Färbung. B) Graphische Analyse. Frequenz der FoxP3⁺ Zellen jeweils bezogen auf $CD4^+CD8^-$ (Punkte) oder $CD4^+CD8^+$ (Dreiecke) T-Zellen. Durchführung von zwei unabhängigen Experimenten. Identische Ergebnisse wurden mit ICOS KO Mäusen auf BALB/c Hintergrund erhalten.

Eine Reduktion der Regulatorischen T-Zellen im Thymus der ICOS KO Mäuse lag nicht vor, eher noch waren die Zellzahlen minimal erhöht. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass ICOS keine Rolle bei der Generierung von Regulatorischen T-Zellen im Thymus spielt, sondern Auswirkungen auf die Homöostase der Regulatorischen T-Zellen hat (siehe 3.6 und 3.9).

3.5 ICOS trägt entscheidend zur Expansion und Differenzierung Antigen-spezifischer Effektorzellen bei

3.5.1 Einführung des verwendeten adoptiven Transfersystems

Die Analyse der T-Zellsubpopulationen in ICOS KO Mäusen stellt eine Momentaufnahme dar, gibt jedoch keinen Aufschluß über die zugrundeliegenden Mechanismen. Um die genaue Entwicklung einer einzigen Zelle von der Aktivierung über die Differenzierung bis hin zur Apoptose verfolgen zu können, wurde ein adoptives Transfersystem mit T-Zellrezeptor (TZR) transgenen Mäusen verwendet. Damit war es möglich die *de-novo* Generierung von Effektorzellen aus naiven ($< 3.5\%$ CD62L^{low}) Ovalbumin- (OVA-) spezifischen T-Zellen nachzuvollziehen. Für die Funktionsanalyse von ICOS wurden WT OT-II Zellen in zwei unterschiedliche Rezipientengruppen transferiert: WT und ICOS-L KO (Abb. 9A). Die Immunisierung erfolgte lokal mittels OVA 24h nach der intravenösen Injektion der Zellen (Abb. 9A). Die transgenen T-Zellen wurden mit Hilfe des Markers Thy-1.1 detektiert (Abb. 9B) und zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Wie Abbildung 9C zeigt, beginnen die Zellen nach etwa 1-2 Tagen stark zu expandieren. Zum Zeitpunkt des Expansionsmaximum, an Tag 3-4, sind 15% aller CD4⁺ T-Zellen Thy-1.1⁺, dies entspricht einer ca. 2,3%igen Population bezogen auf alle Zellen des drainierenden Lymphknotens. Ab Tag 4 ist eine stetige Abnahme der Thy-1.1⁺ T-Zellen zu beobachten, bis nach ca. 18 Tagen die Ausgangsfrequenz wieder erreicht wird. Abbildung 9D zeigt die Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen anhand der ICOS-Expression. Auch diese erreicht ca. 48 h nach Immunisierung ihr Maximum und nimmt darauffolgend kontinuierlich wieder ab. Im Vergleich zu anderen T-Zellaktivierungsmarkern wie CD69 oder CD25 (Daten nicht gezeigt) bleibt ICOS jedoch relativ lange exprimiert; selbst nach 14 Tagen ist das Expressionsniveau noch deutlich höher als zu Beginn.

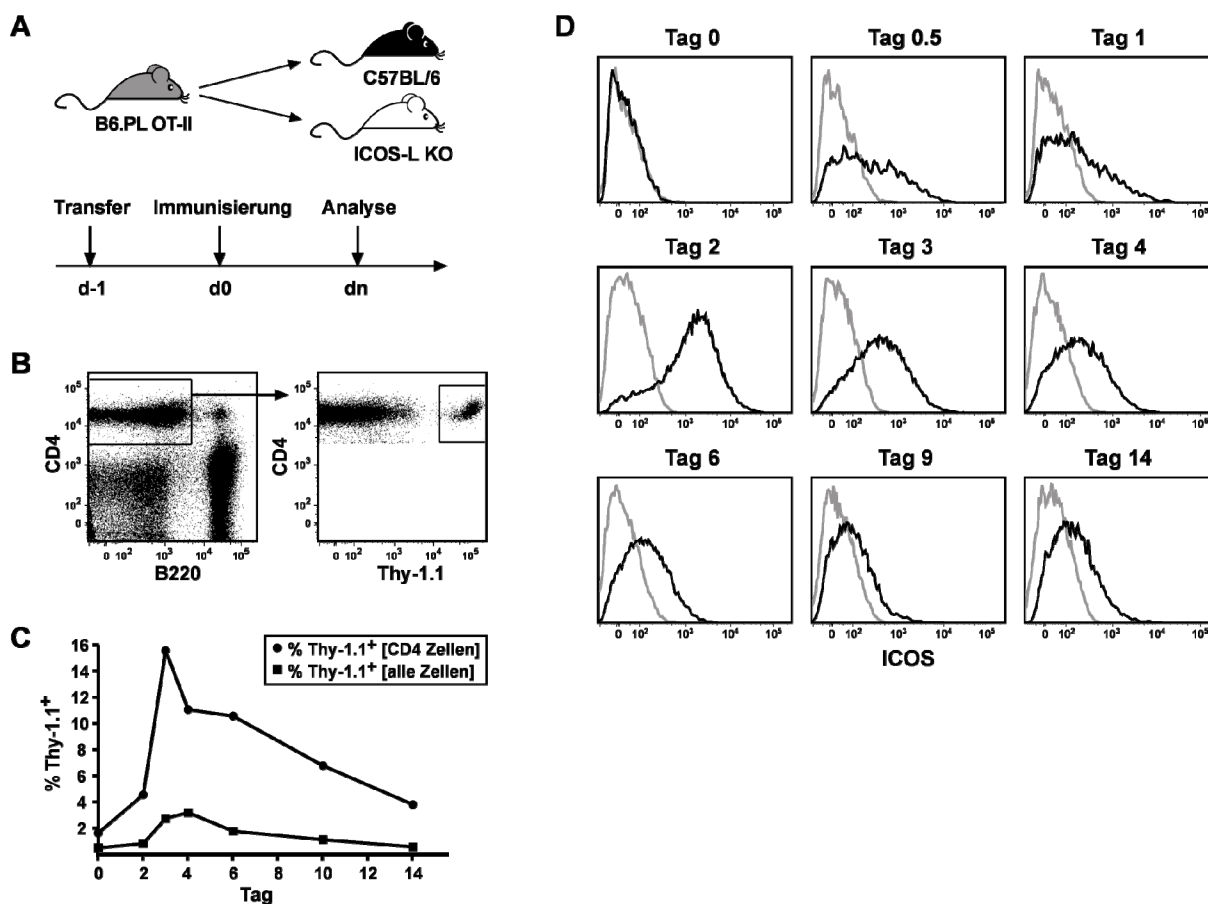


Abb. 9: Antigen-spezifisches adoptives Transfersystem

A) Eine definierte Anzahl OVA-spezifischer, TZR transgener Zellen (aus B6.PL OT-II Mäusen) wurde adoptiv in WT oder ICOS-L KO Rezipientenmäuse transferiert. Die Analyse der Zellen erfolgte durch Präparation von Milz, LN oder Blut des Rezipienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Immunisierung. B) Repräsentative Färbung zur Detektion der Antigen-spezifischen T-Zellen mit CD4 und Thy-1.1 (nach Ausschluss von DAPI⁺ und B220⁺ Zellen). C) Expansion von Thy-1.1⁺ T-Zellen im drainierenden LN von WT Rezipienten bezogen auf CD4⁺ bzw. alle Zellen an Tag 0 bis 14. D) ICOS-Expression transgener Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Immunisierung (schwarzes Histogramm) und Spezifitätskontrolle durch Vorinkubation mit dem 100-fachen Überschuss des ungelabelten Antikörpers (graues Histogramm).

3.5.2 Der Aktivierungszustand einer Zelle ist unabhängig von ICOS

Neben ICOS wurde auch eine breite Palette anderer Zelloberflächenmarker analysiert. Überraschenderweise beeinträchtigte die fehlende ICOS-ICOS-L Interaktion die Expression verschiedener T-Zellaktivierungsmarker in keinsten Weise. CD25, CD69, 4-1BB, CD28, GITR und OX-40 wurden in ICOS-L KO Rezipiententieren genauso reguliert wie in der WT

Kontrollgruppe (Abb. 10A). Dies gilt sowohl für frühe Zeitpunkte (6 h und 12 h) als auch für relativ späte Zeitpunkte (Tag 3 bis 8; Daten nicht gezeigt).

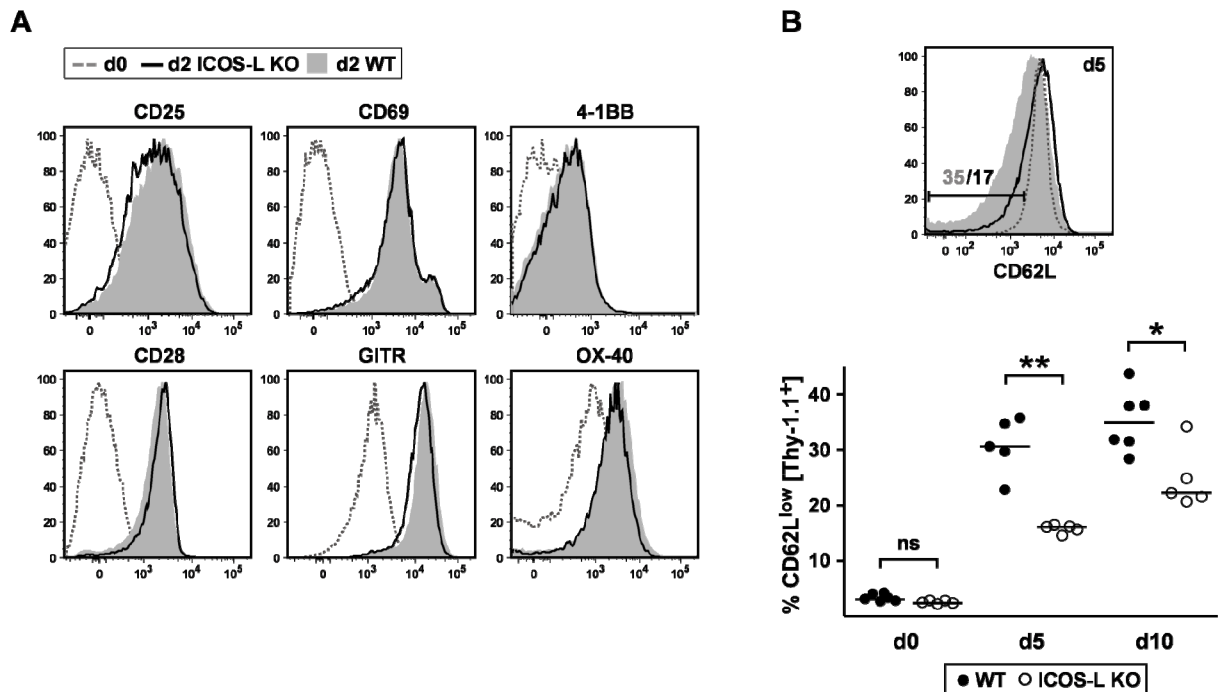


Abb. 10: Analyse von Aktivierungsmarkern auf den transgenen Zellen

Durchflusszytometrische Messung der Expression diverser Aktivierungsmarker auf transferierten, Antigen-spezifischen T-Zellen. A) Gezeigt ist die Expression auf CD4⁺Thy-1.1⁺ T-Zellen aus den drainierenden LN von WT (ausgefülltes graues Histogramm) und ICOS-L KO Rezipienten (schwarzes Histogramm) 2 Tage nach Immunisierung. Die gestrichelte Linie zeigt die Expression des jeweiligen Aktivierungsmarkers für Tag 0. B) CD62L Expression von Thy-1.1⁺ T-Zellen 5 Tage nach Immunisierung. Das Histogramm zeigt eine repräsentative Färbung (Deklaration des Histogramms wie in A); die Zahlen geben die Frequenz der CD62L^{low} Fraktion in der WT (grau) oder ICOS-L KO (schwarz) Gruppe bezogen auf alle transgenen T-Zellen an. Im Diagramm ist die statistische Analyse der CD62L^{low} Frequenzen transgener T-Zellen abgebildet. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment für A+B von insgesamt vier. Gleiche Ergebnisse wurden beim Transfer von OT-II ICOS KO Zellen in WT Rezipienten erzielt.

Der einzige auffällige Marker von allen untersuchten Oberflächenmarkern, der Unterschiede zeigte, war CD62L. Der Anteil an CD62L^{low} Zellen innerhalb der transgenen Population in ICOS-L KO Rezipienten war an Tag 5 und 10 um ca. 40% reduziert (Abb. 10B). Insofern spiegelt sich in dem adoptiven Transfersystem die Situation unter homöostatischen Bedingungen in einer ICOS KO Maus wider, denn in beiden Fällen resultiert die Störung des ICOS Signals in einer verminderten Zahl an Effektorzellen (siehe Abb. 7).

3.5.3 ICOS ist entscheidend für die Expansion transgener T-Zellen

Als weiterer Parameter wurde die Expansion der Antigen-spezifischen T-Zellen untersucht. Hierbei ist zu beachten, dass die lokale Injektion des Antigens nicht nur zu einer Zunahme der Antigen-spezifischen T-Zellen (siehe 3.5.1), sondern auch zur Einwanderung anderer Zellen in den drainierenden LN führt. Bereits publiziert ist, dass bei einer Immunisierung mit Freund's Adjuvanz in ICOS KO Mäusen eine verringerte Rekrutierung Antigen-un-spezifischer B-Zellen in die LN stattfindet (Loke et al. 2005). Im Falle des vorliegenden Transfersystems waren jedoch die absoluten Zellzahlen als auch das CD4/B-Zellverhältnis in den LN beider Vergleichsgruppen über den kompletten Analysezeitraum vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Für die Analyse der transgenen T-Zellen können somit die endogenen CD4⁺ T-Zellen als Referenzpopulation festgelegt werden. Dies ist insofern günstig, da bei der Präparation eines einzelnen LN ein unkalkulierbarer Zellverlust nicht ausgeschlossen werden kann und die Angabe absoluter Zellzahlen erschwert wird. Beim Vergleich der beiden Rezipientengruppen bezüglich der Startzellzahl 24 h nach dem Transfer fand sich kein Unterschied. Die Rekrutierung der transgenen Zellen in den drainierenden LN wird demnach nicht von ICOS beeinflusst (Abb. 11B).

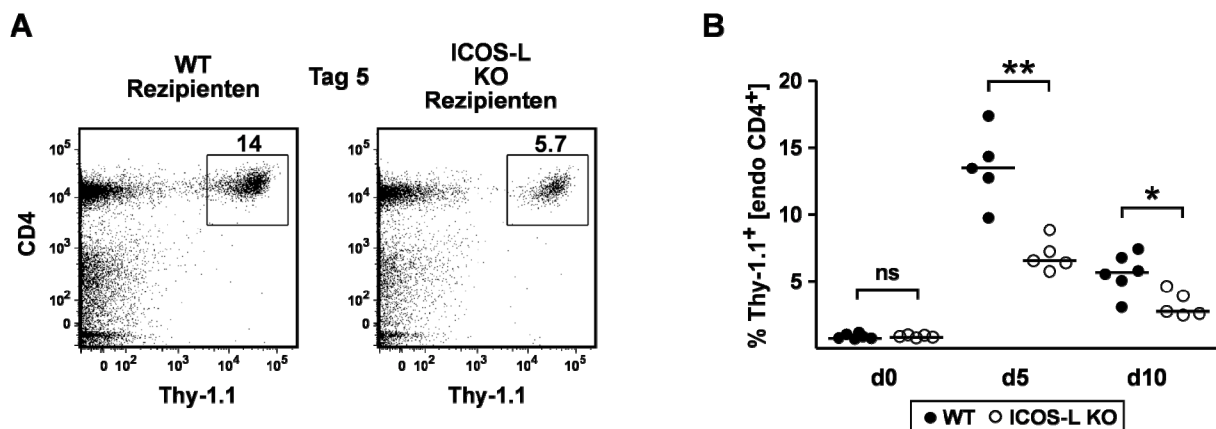


Abb. 11: Expansion Antigen-spezifischer T-Zellen

Frequenz transgener T-Zellen in WT und ICOS-L KO Rezipienten. A) Repräsentative Färbung an Tag 5 und B) Statistische Analyse für verschiedene Zeitpunkte. Alle angegebenen Werte sind Frequenzen von CD4⁺ Thy-1.1⁺ Zellen bezogen auf die endogenen CD4⁺ T-Zellen der jeweiligen Rezipientenmaus. Gezeigt ist eines von mindestens 10 durchgeführten Experimenten. Die gleichen Ergebnisse werden beim Transfer von OT-II ICOS KO Zellen in WT Rezipienten erhalten.

Dies ändert sich jedoch nach Immunisierung und Expansion der transgenen T-Zellen. Die Frequenz und die absolute Zahl der Antigen-spezifischen Zellen in ICOS-L KO Mäusen waren im Vergleich zu WT Rezipienten wesentlich verringert (Abb. 11). Um eine genauere Aussage über die Zahl der Zellteilungen *in vivo* zu erhalten, wurden die transgenen T-Zellen vor dem Transfer mit dem Farbstoff CFSE markiert. Wie in Abbildung 12 deutlich wird, war der Anteil der Teilungsgenerationen 0 bis 6 in den ICOS-L KO Rezipienten deutlich höher als in der WT Vergleichsgruppe. Im Gegenzug waren die Zellen der späteren Generationen (Gen 7+) prozentual deutlich weniger vertreten.

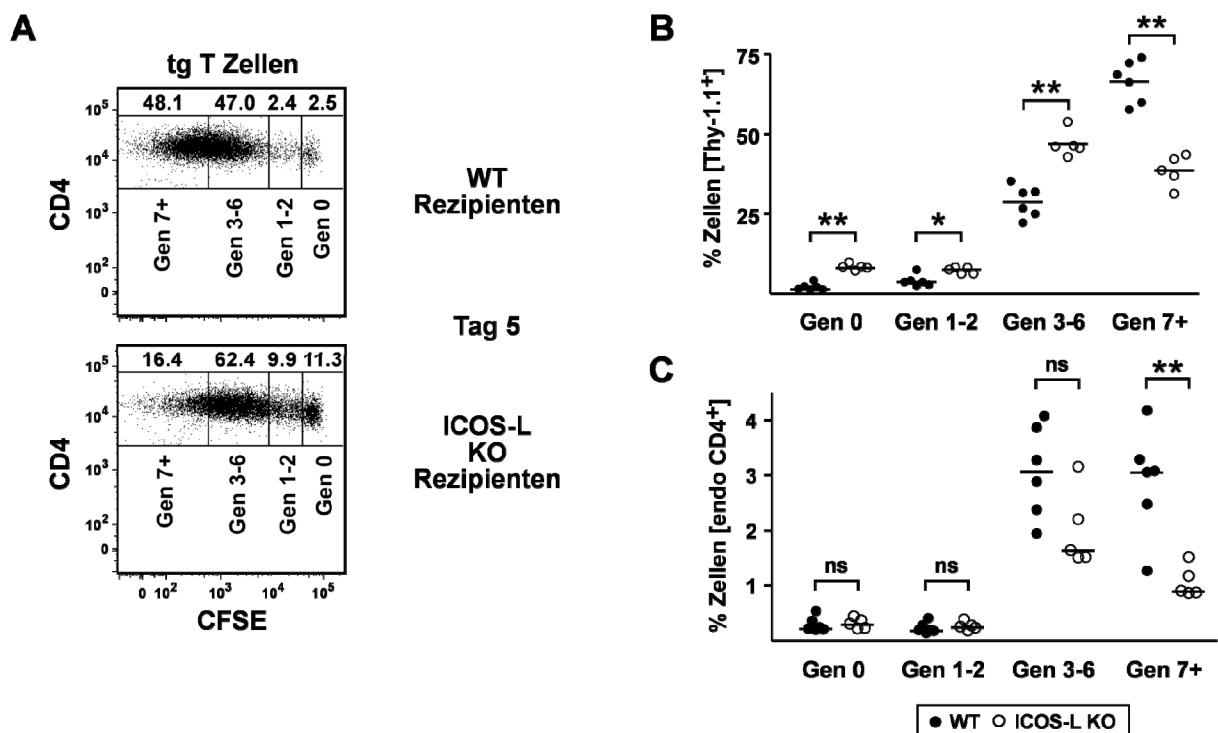


Abb. 12: CFSE-Markierung der transgenen T-Zellen zur Beurteilung der Proliferation

Antigen-spezifische Zellen wurden mit CFSE markiert und in WT oder ICOS-L KO Rezipienten transferiert. Analyse der drainierenden LN der Rezipiententiere 5 Tage nach Immunisierung. A) Die Färbung zeigt die Unterteilung der Thy-1.1⁺ T-Zellen in verschiedene Generationen basierend auf der CFSE Intensität. Die Zahlen geben die prozentuale Verteilung der Generationen innerhalb der transgenen T-Zellen an. B) Frequenzen der Generationen bezogen auf alle Thy-1.1⁺ T-Zellen und C) auf die endogenen CD4⁺ T-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt fünf. Die gleiche Aussage wird beim Transfer von OT-II ICOS KO Zellen in WT Rezipienten erhalten.

Berücksichtigt man zusätzlich die Reduktion der Gesamtzahl transgener Zellen (siehe Abb. 11), führt dies dazu, dass absolut betrachtet die Zellen der frühen Generationen zu gleicher Zahl vorhanden sind und nur Zellen mit 3 oder mehr Teilungszyklen eine dramatische Abnahme zeigen (Abb. 12C). Um herauszufinden, ob dieses Phänomen durch verändertes Migrationsverhalten hervorgerufen wird, erfolgte zusätzlich eine Analyse der nichtdrainierenden LN und des peripheren Blutes. An Tag 3, wenn die ersten Antigen-spezifischen Zellen den drainierenden LN wieder verlassen, fanden sich auch dort weniger Zellen in späteren Teilungsstadien (Daten nicht gezeigt).

3.6 ICOS beeinflusst die Expansion von Antigen-spezifischen Regulatorischen T-Zellen

Die lokale Immunisierung mit Adjuvanz führt bevorzugt zur Expansion der FoxP3-negativen Effektor T-Zellen im drainierenden LN (FoxP3⁺ T-Zellen < 3%). Um das Verhalten der Antigen-spezifischen Regulatorischen T-Zellen analysieren zu können, wurde das Immunisierungsprotokoll variiert.

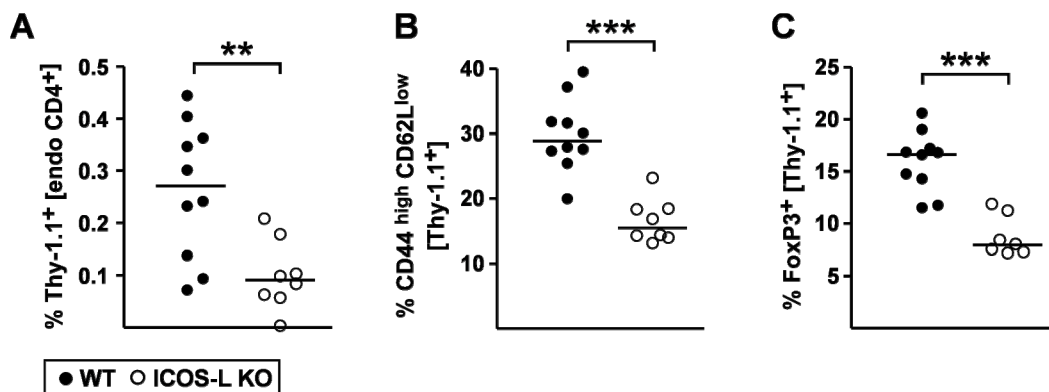


Abb. 13: Analyse Antigen-spezifischer Regulatorischer T-Zellen

Experimenteller Aufbau wie in Abbildung 9, Transfer von OT-II Splenozyten in WT bzw. ICOS-L KO Rezipienten, lediglich veränderte Immunisierungsstrategie. Systemische Immunisierung mit 2 mg Endotoxin-freiem OVA i.v.. Durchflusszytometrische Analyse von Milzzellen der Rezipiententiere an Tag 12. A) Frequenzen der Thy-1.1⁺ T-Zellen bezogen auf die endogenen CD4⁺ T-Zellen. B) Frequenzen der Effektor-Memory-Zellen (CD44^{high}CD62L^{low}) und C) der Regulatorischen Zellen (FoxP3⁺) innerhalb der transgenen T-Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von drei.

Systemisch verabreichtes Endotoxin-freies Ovalbumin führt bekanntermaßen zu einer verstärkten Generierung von Regulatorischen T-Zellen in der Milz (Thorstenson und Khoruts 2001). Am Tag 12 nach der OVA-Injektion wurden deutlich weniger Antigen-spezifische Zellen in den Milzen der ICOS-L KO Rezipienten gefunden (Abb. 13A). Wie schon bei der lokalen Immunisierung mit Adjuvanz waren innerhalb der transgenen Zellpopulation weniger T-Zellen mit einem Effektor-Memory Phänotyp ($CD62L^{low}CD44^{high}$), sowie Zellen in späten Generationen der Zellteilung zu finden (Abb. 13B and Daten nicht gezeigt). Der wichtigste Aspekt ist die signifikant minimierte Zahl $FoxP3^{+}$ Antigen-spezifischer T-Zellen (Abb. 13C). Der um $\frac{2}{3}$ verringerte Anteil transgener T-Zellen kombiniert mit der selektiven Reduktion der Regulatorischen T-Zellen innerhalb der transgenen Population (ca. um den Faktor 2) führt letztendlich zu einer 6-fach geringeren Zahl an transgenen $FoxP3^{+}$ T-Zellen in ICOS-L KO Rezipienten. ICOS beeinflusst somit in starkem Maße die Populationsgröße der Regulatorischen T-Zellen.

3.7 Der Zellzyklusverlauf zeigt sich von ICOS unbeeinträchtigt

Die bisher erhaltenen Ergebnisse lassen folgende Interpretationen zu: 1. T-Zellen, die bereits mehrfache Teilungszyklen durchlaufen haben, benötigen ein Signal über ICOS, um sich erneut zu teilen oder 2. das Langzeitüberleben der T-Zellen wird über die ICOS-Kostimulation gesteuert. Letztlich schließen sich beide Möglichkeiten nicht aus und könnten als komplexes Zusammenspiel wirken. Mittels einer Kombination aus CFSE-Markierung und Kurzzeit-Inkorporation von BrdU kann eine Momentaufnahme der Proliferation zu definierten Zeitpunkten erzielt werden. Im Versuch bauten an Tag 1,5 und 3 bis zu 35% aller $Thy-1.1^{+}$ T-Zellen BrdU während des 2-stündigen Pulses in ihre DNA ein (Abb. 14A, B). An späteren Zeitpunkten, wie Tag 5 und 8 wurde kaum noch DNA synthetisiert. Alle Experimente zeigten einen nur minimal geringeren BrdU Einbau in der ICOS-L KO Gruppe (Abb. 14B), wobei die Proliferationsrate späterer Generationen nicht selektiv beeinträchtigt war (Abb. 14D). Die Erklärung, dass sich die T-Zellen nach einer bestimmten Anzahl an Zellteilungen nicht mehr weiter teilen, wenn die ICOS Kostimulation unterbunden wird, kann somit ausgeschlossen werden. Die absolut identische Fluoreszenzintensität des BrdU Signals in beiden Gruppen weist darauf hin, dass die DNA-Syntheserate unabhängig von ICOS ist.

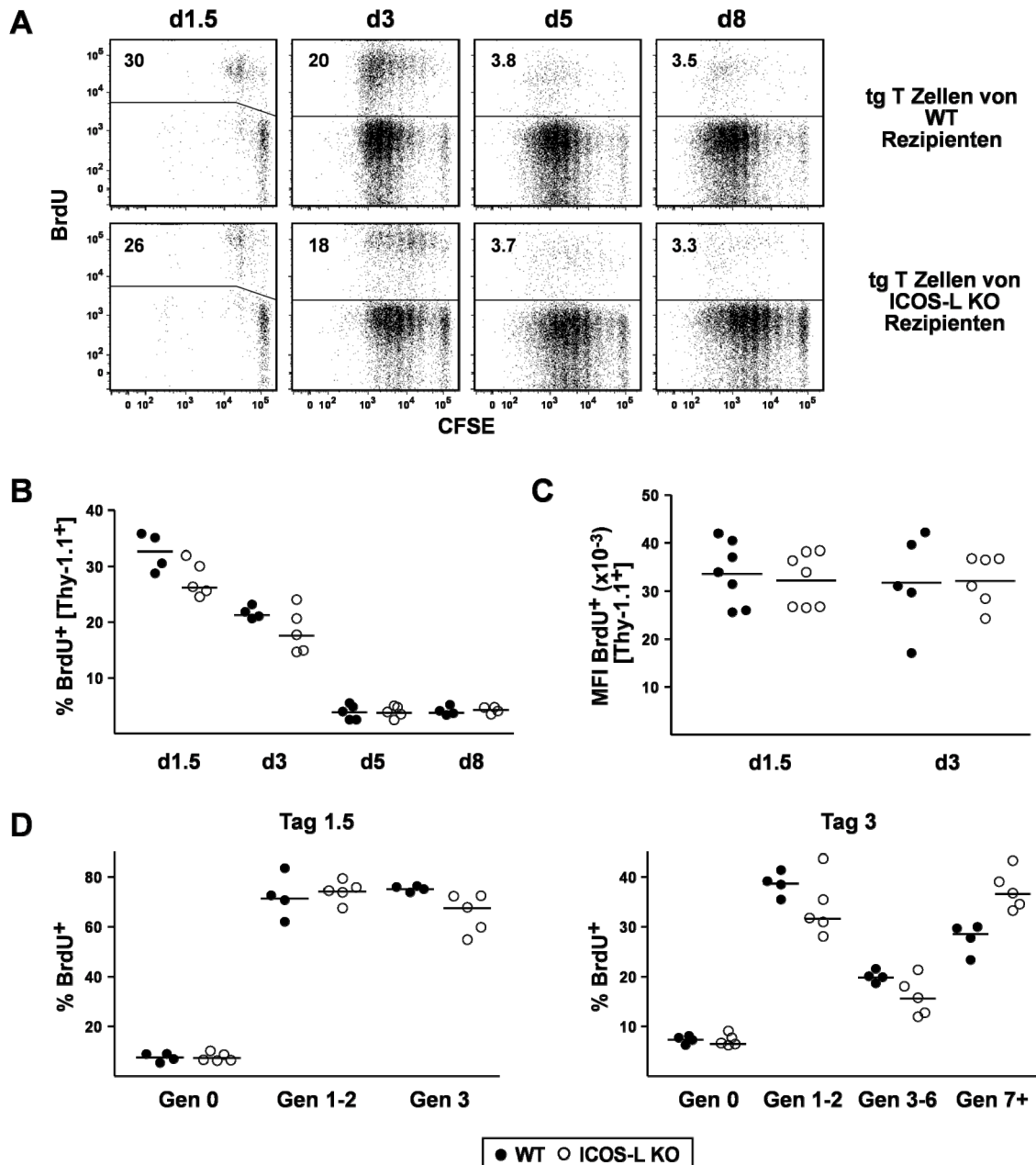


Abb. 14: Analyse der Kurzzeit Proliferation durch BrdU Einbau

Kombinierte Proliferationsanalyse OVA-spezifischer T-Zellen mit CFSE und BrdU. CFSE markierte Antigen-spezifische Zellen wurden in WT oder ICOS-L KO Rezipienten transferiert. Die Immunisierung erfolgte lokal. 2 h bevor die drainierenden LN den Rezipienten entnommen wurden, erhielten die Mäuse 1 mg BrdU i.v.. A) Repräsentative Färbungen der transgenen T-Zellen für BrdU und CFSE sowie B) Anteil an BrdU⁺ Zellen innerhalb der transgenen Fraktion an Tag 1,5; 3; 5 und 8. C) MFI der BrdU Färbung. D) Anteil der BrdU⁺ Zellen innerhalb früher (Gen1+2), mittlerer (Gen3-6) und später Generationen (Gen 7+). Die Definition der Generation erfolgte mittels CFSE Färbung. Gezeigt ist eines von drei Experimenten.

Für eine weitergehende Analyse wurden zusätzlich verschiedene Zellzyklusphasen untersucht. Wiederholt befanden sich geringfügig, jedoch nicht signifikant, weniger transgene T-Zellen der ICOS-L KO Gruppe in der S-Phase (Abb. 15A, B). Der leicht erhöhte Anteil der Zellen in der $G_{0/1}$ -Phase könnte auf eine verminderte Eintrittswahrscheinlichkeit in den Zellzyklus zurückzuführen sein.

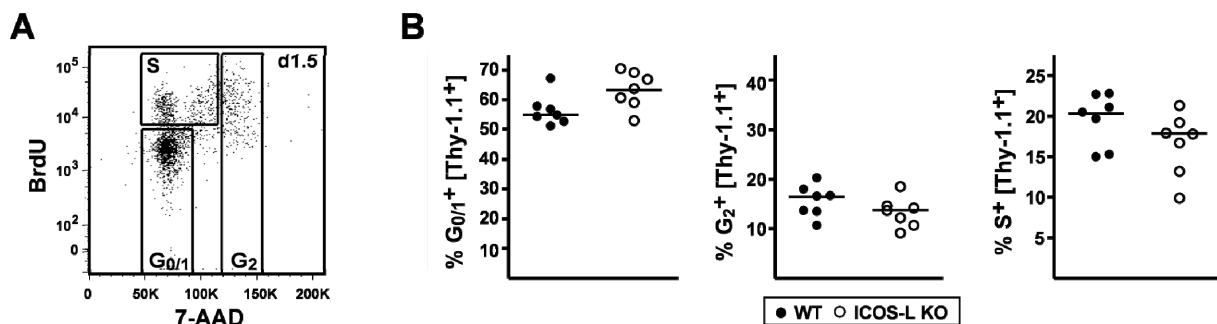


Abb. 15: Zellzyklusanalyse transgener T-Zellen

Analyse des Zellzyklus mittels BrdU-Einbau und Kernfarbstoff 7-AAD. Transfer Antigen-spezifischer Zellen in WT und ICOS-L KO Rezipientenmäuse mit anschließender lokaler Immunisierung. Intravenöse Injektion von 1 mg BrdU 2 h vor Präparation der drainierenden LN der Rezipienten. A) Repräsentative Färbung der Thy-1.1⁺ T-Zellen an Tag 1,5 und Gating auf $G_{0/1}$, S und G_2 -Phase. B) Statistische Analyse der einzelnen Phasen des Zellzyklus. Abgebildet sind die jeweiligen Frequenzen bezogen auf alle transgenen T-Zellen.

3.8 ICOS reguliert die Apoptose transgener CD4⁺ T-Zellen

Um zu prüfen, ob ICOS einen Einfluss auf das Überleben von OT-II T-Zellen besitzt, wurden verschiedene Apoptose-Assays durchgeführt. Früh-apoptotische Zellen konnten mit Hilfe von DAPI und Annexin V detektiert werden (Vermes et al. 1995). Alternativ kamen fluoreszierende Caspase-Inhibitoren (FLICA) und ein Antikörper gegen die aktive Caspase-3 zum Einsatz. Alle drei Methoden lieferten die gleiche Aussage: fehlt die Kostimulation via ICOS kommt es zur verstärkten Apoptose (Abb. 16A, B, C). Dieses Ergebnis bestätigte sich für alle Generationen (Kombination von CFSE und Annexin V Färbung, Daten nicht gezeigt).

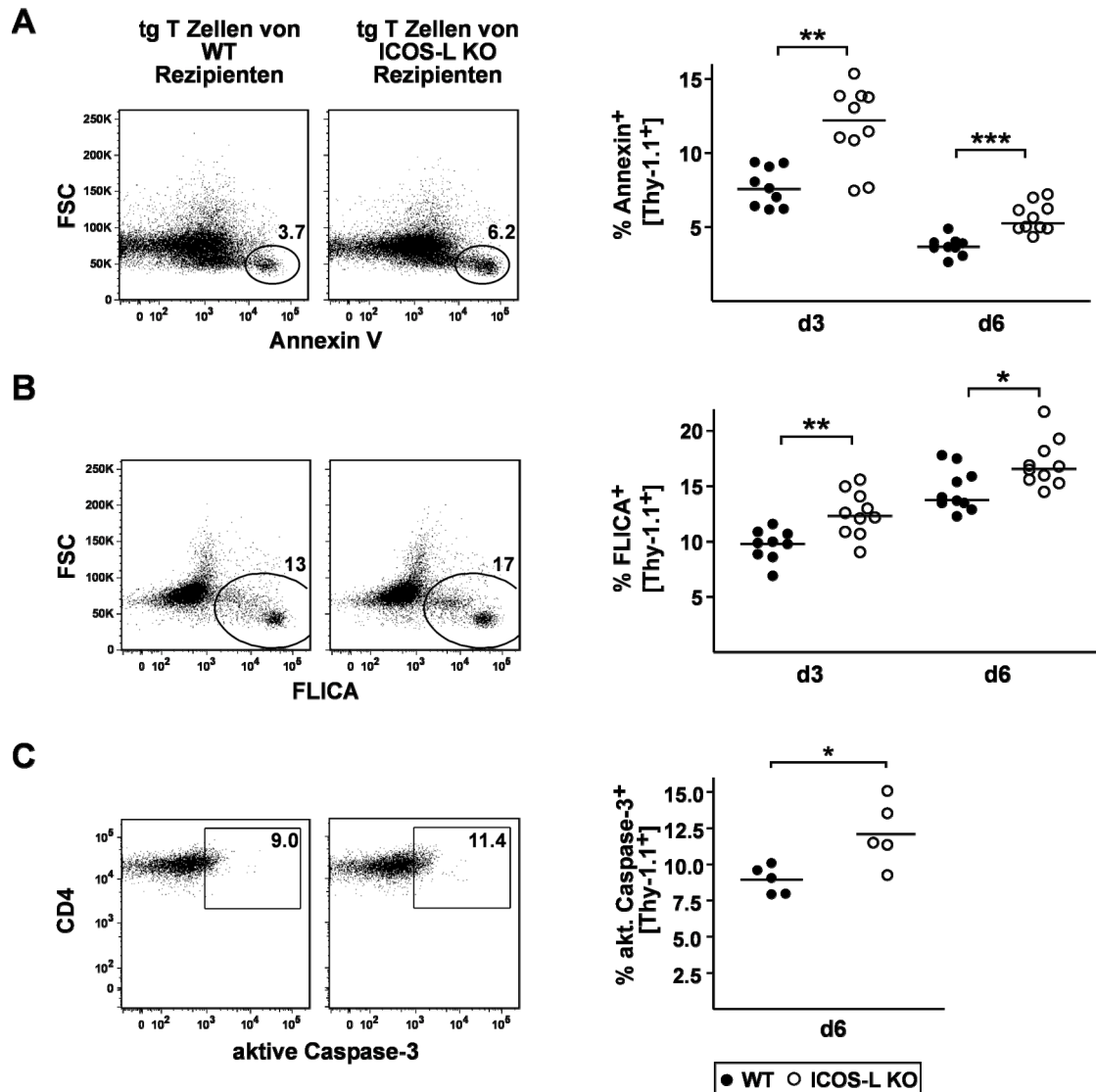


Abb. 16: Bestimmung des Überlebens Antigen-spezifischer T-Zellen

Adoptiver Transfer von OT-II transgenen Zellen und lokale Immunisierung. Analyse der drainierenden LN an Tag 3 und 6. Gezeigt sind transgene $CD4^+Thy-1.1^+B220^-DAPI^{low/-}$ Zellen. A) Früh-apoptotische Zellen konnten mit Annexin V detektiert werden. B) Alternativer Apoptose-Assay unter Verwendung fluoreszierender Caspaseinhibitoren (FLICA). C) Färbung mit einem Antikörper gegen aktive Caspase-3. Jeweils eine repräsentative Färbung ist gezeigt. Die Graphen zeigen den Anteil an Annexin V⁺, FLICA⁺ und aktive Caspase-3⁺ Zellen innerhalb der transgenen T-Zellpopulation an. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Experiment von sechs (A) bzw. zwei (B, C).

3.9 Die Expansion von CD4⁺ T-Zellen durch homöostatische Proliferation wird von ICOS positiv beeinflusst

Um den beobachteten Effekt von ICOS auf den Pool der Antigen-spezifischen Effektor-Memory und Regulatorischen T-Zellen nochmals mit einem unabhängigen experimentellen System abzusichern, wurden polyklonale T-Zellen in Rezipientenmäuse transferiert. Auch ohne experimentelle Immunisierung kann dann eine homöostatische Proliferation beobachtet werden, denn die Effektor-Memory und Regulatorischen T-Zellen teilen sich unter dem Einfluss von Umweltantigenen und Selbstantigenen (Dummer et al. 2001; Gudmundsdottir und Turka 2001; Min et al. 2005). Um die Zellen ebenfalls auf Einzelzelebene untersuchen zu können, wurden B6.PL Mäuse (Thy-1.1) als Donoren verwendet. Diese unterscheiden sich lediglich durch eine Variante von Thy-1 von C57BL/6 (Thy-1.2). Der Transfer der CFSE gelabelten LN-Zellen erfolgte in WT und ICOS-L KO Rezipienten. Die Analyse der peripheren LN 20 Tage nach dem Transfer zeigte, dass eine homöostatische Proliferation in beiden Versuchsgruppen stattgefunden hatte (Abb. 17). Die Gesamtzahl an Thy-1.1⁺ T-Zellen war jedoch in den WT Rezipiententieren signifikant höher (Abb. 17A, B). Nicht nur die T-Zellen, die sich geteilt hatten, zeigten sich beeinflusst, wenn ICOS-L fehlt, sondern auch die ungeteilte Population (Abb. 17B). Bei genauerer Analyse konnte festgestellt werden, dass selektiv die T-Zellen mit einem Effektor-Memory Phänotyp und die Regulatorischen T-Zellen betroffen waren. Dieses Ergebnis spiegelt exakt jenen Zustand wider, den man auch in ICOS KO Mäusen unter homöostatischen Bedingungen findet (siehe Abb. 7) und zeigt, welchen positiven Beitrag ICOS für das Überleben von T-Zellsubpopulationen leistet.

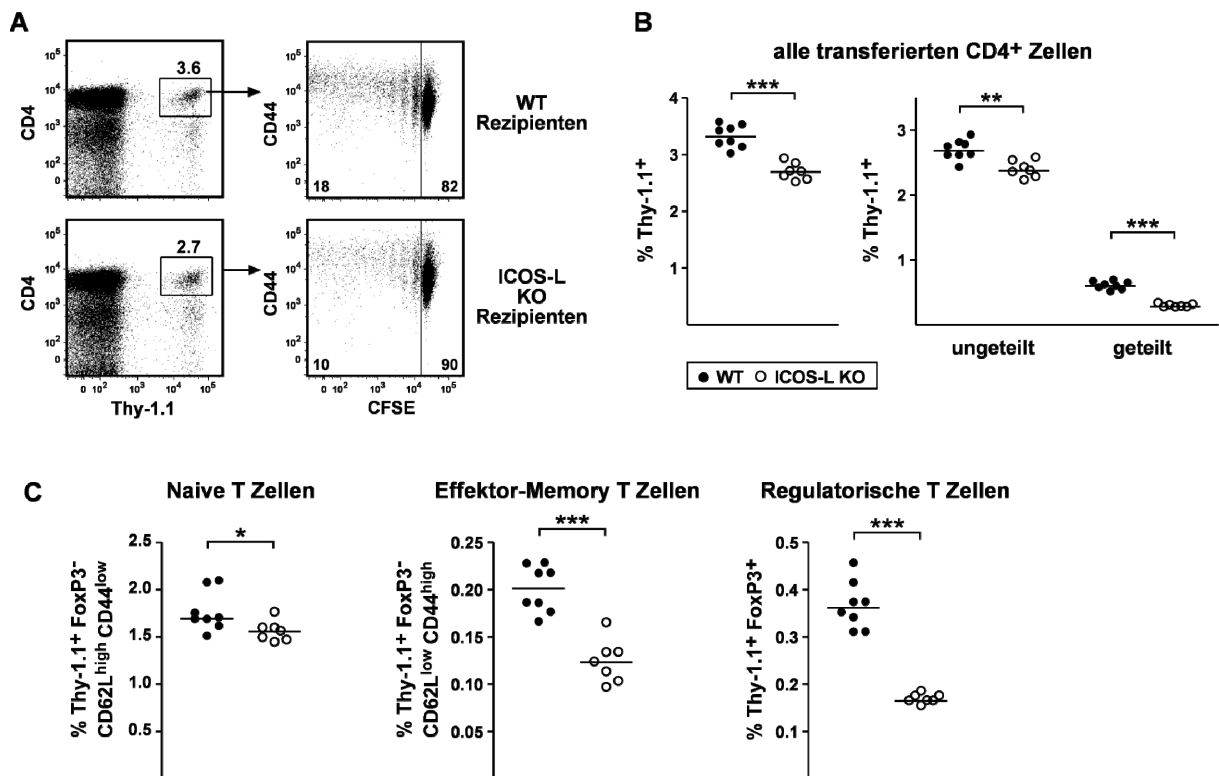


Abb. 17: Homöostatische Proliferation adoptiv transferierter T-Zellen

LN Zellen (25×10^6) von B6.PL Mäusen (Thy-1.1⁺) wurden mit CFSE markiert und in WT oder ICOS-L KO Rezipienten (Thy-1.2⁺) transferiert. Die Analyse der peripheren LN der Rezipientenmäuse erfolgte an Tag 20. A) Repräsentative Färbung ausgehend von MHCII⁻DAPI⁻ Zellen, die die Identifizierung der transferierten Zellen und die Zellteilung anhand von CFSE-Ausverdünnung zeigt. B) und C) Frequenzen der transferierten Zellen in Bezug auf die CD4⁺ T-Zellen der Rezipienten für B) alle transferierten T-Zellen und C) verschiedene T-Zellsubpopulationen. Die Gatingstrategie erfolgte wie in Abbildung 6. Gezeigt ist eines von vier (B) bzw. zwei (C) Experimenten.

3.10 ICOS reguliert die Expansion und das Überleben von Follikulären T-Helferzellen

3.10.1 Detektion und Charakterisierung von Follikulären T-Helferzellen

Bei Analyse der transgenen Zellen im adoptiven Transfersystem, wurde ab Tag 4 eine T-Zellsubpopulation beobachtet, die sich durch eine langanhaltend hohe PD-1 Expression auszeichnete (Abb. 18A). Diese spezifischen T-Zellen, die in ICOS-L KO Rezipienten fast vollständig abwesend waren, konnten bei näherer Untersuchung als Follikuläre B-Helfer

T-Zellen (TFH) identifiziert werden (Abb. 18B). Eines der charakteristischsten Merkmale dieser T-Zellsubpopulation ist die Expression von CXCR5, einem Chemokinrezeptor, welcher die Wanderung der T-Zellen in die B-Zellareale steuert (Akiba et al. 2005; Moser und Ebert 2003). Weiterhin zeichneten sich diese Zellen durch eine starke ICOS- und CD44-Expression aus und regulierten verstärkt die Oberflächenmoleküle OX-40, CD40L, und CTLA-4 hoch (Abb. 18B und King et al. 2008).

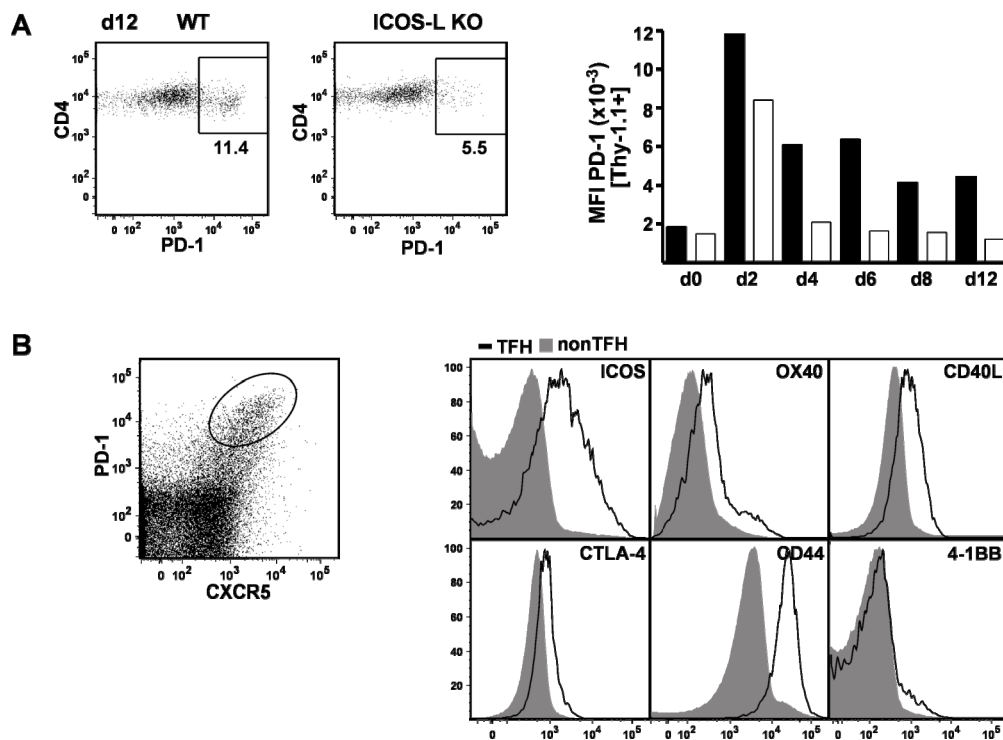


Abb. 18: Detektion von Follikulären T-Helferzellen

A) Adoptiver Transfer, lokale Immunisierung und Analyse der drainierenden LN. Gezeigt ist die PD-1^{high} Population innerhalb der Thy-1.1⁺ T-Zellen anhand einer repräsentativen Färbung an Tag 12 und der Kinetik jeweils für WT (schwarze Balken) und ICOS-L KO Rezipienten (weiße Balken). B) Kombinierte Färbung von PD-1 und CXCR5 zur Detektion der Follikulären T-Helferzellen (TFH). C57BL/6 Mäuse wurden mit NP-OVA/Alum und *Bordetella pertussis* s.c. immunisiert und die drainierenden LN nach 5 Tagen untersucht. Dargestellt ist die Identifizierung der PD-1^{high}CXCR5^{high} Population von CD4⁺B220⁻DAPI⁻ Zellen. Diverse Aktivierungsmarker gemessen auf PD-1^{high}CXCR5^{high} (schwarzes Histogramm) und PD-1⁻CXCR5⁻ (ausgefülltes graues Histogramm) T-Zellen. Gezeigt ist eines von fünf (A) bzw. zwei (B) Experimenten.

3.10.2 Die Entwicklung Follikulärer T-Helferzellen ist ICOS-abhängig

Um die Faktoren für die Entwicklung dieser Follikulären T-Helferzellen Zellen näher zu untersuchen, wurden verschiedene Knock-out Mäuse analysiert. In lokal immunisierten WT Mäusen entwickelten nach 6 Tagen ca. 5-6% aller $CD4^+$ T-Zellen im drainierenden LN einen Follikulären T-Helferzellphänotyp (Abb. 19A und Daten nicht gezeigt).

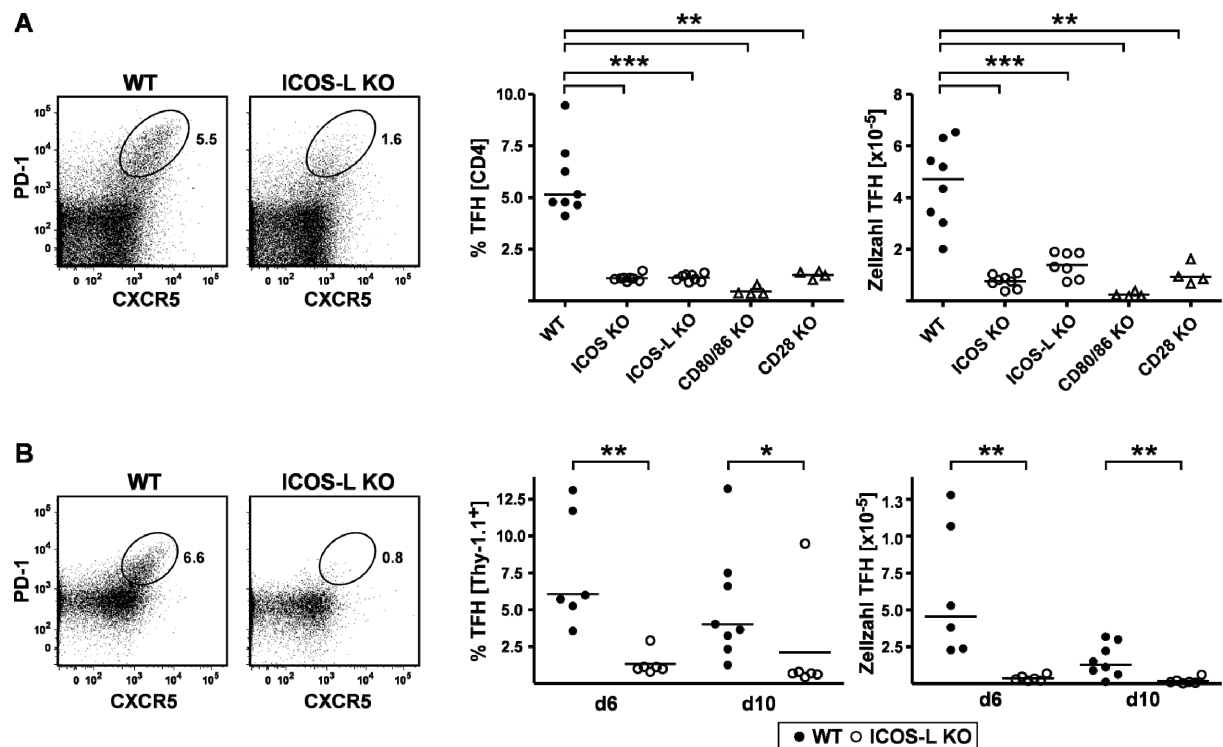


Abb. 19: Anzahl und Expansion von Follikulären T-Helferzellen

Färbung der Follikulären T-Helferzellen ($CXCR5^{\text{high}}PD-1^{\text{high}}CD4^+B220^-DAPI^-$) in lokal immunisierten Mäusen ohne (A) und mit (B) transferierten Antigen-spezifischen Zellen. A) Repräsentative Färbung von WT und ICOS-L KO LN Zellen 6 Tage nach Immunisierung. Statistische Analyse der $CXCR5^{\text{high}}PD-1^{\text{high}}$ T-Zellen für WT, ICOS KO, ICOS-L KO, CD80/86 KO und CD28 KO Mäuse. TFH-Zellfrequenzen bezogen auf alle $CD4^+$ Zellen sowie absolute Zellzahl. B) Repräsentative Färbung transgener T-Zellen 6 Tage nach Immunisierung. Statistische Analyse der Frequenzen bezogen auf Thy-1.1⁺ T-Zellen und absolute Zellzahl. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von drei.

In ICOS KO, ICOS-L KO, CD28 KO und CD80/CD86 KO Mäusen lag dieser Anteil dagegen nur bei ungefähr 1%. Die Entwicklung der Follikulären T-Helferzellen ist somit von der CD28 Kostimulation als auch vom ICOS-ICOS-L Signal abhängig. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit Antigen-spezifischen Zellen erhalten. Nach adoptivem Transfer von OT-II Zellen waren 6 Tage nach dem ersten Antigenkontakt 7,5% aller transgenen $CD4^+$ T-Zellen

CXCR5^{high}PD-1^{high} (Abb. 19B). Fehlte das über ICOS Kostimulation vermittelte Signal zur Differenzierung, wurde die Entwicklung dieser Subpopulation fast vollständig unterbunden.

3.10.3 ICOS allein, nicht PD-1, ist entscheidend für die Existenz der Follikulären T-Helferzellen

ICOS Kostimulation fördert nicht nur die Entstehung von TFH Zellen nach 5-6 Tagen, sondern ist auch bereits in der frühen Phase (d2-3) an der Regulation von PD-1 entscheidend beteiligt (Abb. 18A). Zusammen mit der starken PD-1 Expression von TFH Zellen legt dieser Befund die Vermutung nahe, dass PD-1 direkt an der Entstehung von TFH beteiligt sein könnte. Zur Untersuchung dieser Hypothese erhielten WT Rezipienten nach Transfer Antigen-spezifischer Zellen sowie Immunisierung blockierende Antikörper gegen PD-1 (Abb. 20). Zusätzlich sollte auch noch folgende Fragestellung adressiert werden: Ist das Signal über ICOS für die Entwicklung oder für das Überleben von Follikulären T-Helferzellen wichtig? Entsprechenden Versuchsgruppen wurde nur bis Tag 6 oder erst ab Tag 5 anti-ICOS-L Antikörper injiziert.

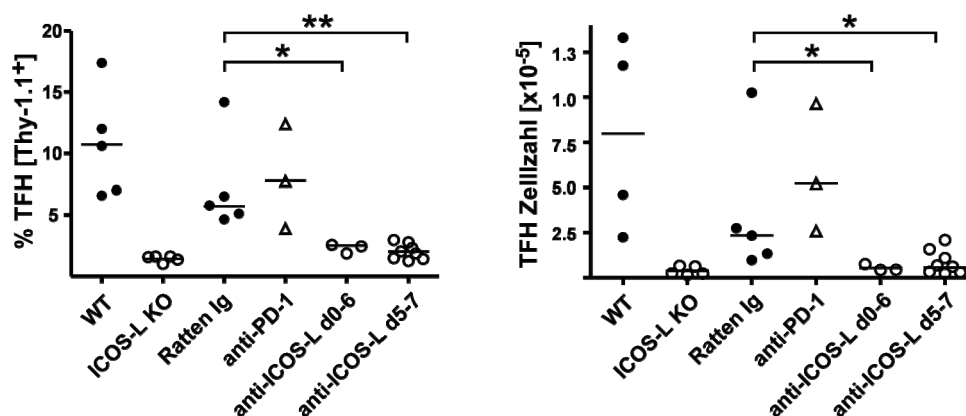


Abb. 20: Suppression der Expansion von Follikulären T-Helferzellen

OVA-spezifische Zellen wurden in WT Rezipienten transferiert und mittels lokaler Immunisierung aktiviert. Als Positivkontrolle diente der zusätzliche Transfer in ICOS-L KO Mäuse. Der Kontrollgruppe wurden 150 µg Ratten Ig i.p. injiziert. Die jeweiligen Versuchsgruppen erhielten: 100 µg anti-PD-1 (RMPI-14) vor der Immunisierung, 80 µg an Tag 2 und 4 und 50 µg am sechsten Tag. Anti-ICOS-L (150 µg MIL-5733) wurde an Tag 0, 2, 4, 6 oder 5, 6 und 7 verabreicht. An Tag 8 fand die Untersuchung der drainierenden LN statt. Dargestellt sind die Frequenzen der PD-1^{high}CXCR5^{high} Population innerhalb der Thy-1.1⁺ T-Zellen (B220⁻ DAPI) und die absoluten Zellzahlen der Follikulären T-Helferzellen.

Nach Verabreichen von anti-PD-1 Antikörper wurde keine Reduktion der Follikulären T-Helferzellen im Vergleich zur Ratten Ig Kontrollgruppe beobachtet. Eine Antikörperinjektion gegen ICOS-L kann jedoch nicht nur in frühen Phasen, sondern auch noch zu späten Zeitpunkten die Existenz der Follikulären T-Helferzellen beeinträchtigen. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass ICOS auch für Follikuläre T-Helferzellen das Überleben reguliert.

3.11 Expression von Zytokinen

3.11.1 Zytokinprofil von ICOS^{high} CD4⁺ T-Zellen

Bereits früher konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass ein enger Zusammenhang zwischen der ICOS-Expression und dem Potential einer T-Zelle IL-10 zu sezernieren besteht (Löhning et al. 2003). In Kapitel 3.2 wurde bereits beschrieben, dass fast alle Regulatorischen T-Zellen ICOS auf sehr hohem Niveau exprimieren. Es stellt sich nun die Frage, ob T-Zellen mit hoher ICOS-Expression, die gleichzeitig IL-10 produzieren, ausschließlich Regulatorische T-Zellen darstellen. Mit Hilfe einer kombinierten Messung von Zytokin-Produktion und FoxP3-Expression wurde diese Fragestellung untersucht. Abbildung 21 zeigt, dass ca. 50% aller ICOS^{high} T-Zellen FoxP3⁺ sind, wobei der restliche Anteil aus FoxP3⁻ Effektor T-Zellen besteht. Während IFN- γ und IL-4 fast ausschließlich von FoxP3⁻ Effektor Zellen produziert werden, erfolgt die IL-10 Produktion von Regulatorischen und Effektor T-Zellen gleichermaßen.

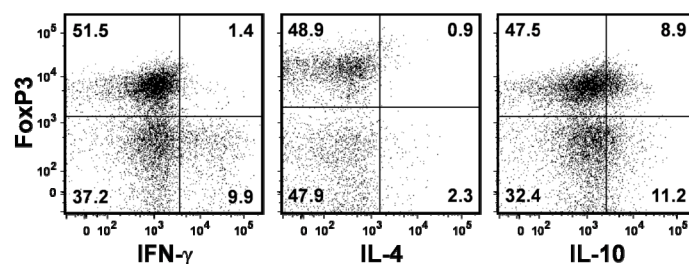


Abb. 21: Zytokinexpression von CD4⁺ICOS^{high} T-Zellen

LN Zellen von C57BL/6 WT Mäusen wurden für 4,5 h mit PMA/Ionomycin stimuliert. Die Färbung auf Regulatorische T-Zellen (FoxP3) wurde mit intrazellulären Zytokinfärbungen (IFN- γ und IL-10) oder einem Zytokin Sekretions Assay (IL-4) kombiniert. In den *Dot Plots* ist die jeweilige Expression des angegebenen Zytokins von der ICOS^{high} T-Zellpopulation gezeigt. Die Zahlen in den Quadranten geben den Prozentsatz bezogen auf alle DAPI⁻B220⁻CD4⁺ICOS^{high} T-Zellen an.

3.11.2 Antigen-spezifische T-Zellen und ihre Zytokine

Der Transfer von Antigen-spezifischen T-Zellen in WT und ICOS-L KO Rezipienten mit anschließender lokaler Immunisierung hat gezeigt, dass der Zellpool der transgenen Effektor T-Zellen durch die fehlende ICOS Kostimulation entscheidend beeinträchtigt wird, nicht jedoch die frühe Aktivierung. Nun sollten Antigen-erfahrene Zellen auf die Fähigkeit geprüft werden Effektorzytokine auszuschütten. Dazu wurden die Zellen der drainierenden LN 5 Tage nach Immunisierung isoliert und für 4,5 h mit PMA/Ionomycin oder OVA-Peptid *in vitro* Kurzzeit restimuliert. 26% aller OVA-spezifischen T-Zellen der WT Versuchsgruppe besaßen die Fähigkeit IFN- γ zu produzieren (Abb. 22A). Fehlte das Signal über ICOS waren es nur noch 9% aller Thy-1.1⁺ T-Zellen. Auch die IL-10 Produktion zeigte sich verringert, wobei selektiv die IFN- γ ⁺IL-10⁺ Produzenten reduziert waren. Die Restimulation mit OVA-Peptid führte bei wesentlich geringerer Zytokinausschüttung ebenfalls zu minimierten Werten für IFN- γ in der ICOS-L KO Versuchsgruppe (Abb. 22B). Die Zytokine IL-4, IL-17A und F, IL-13 und IL-5 konnten mit der angewendeten Immunisierungsmethode kaum nachgewiesen werden (< 0,5% von Thy-1.1⁺, Daten nicht gezeigt).

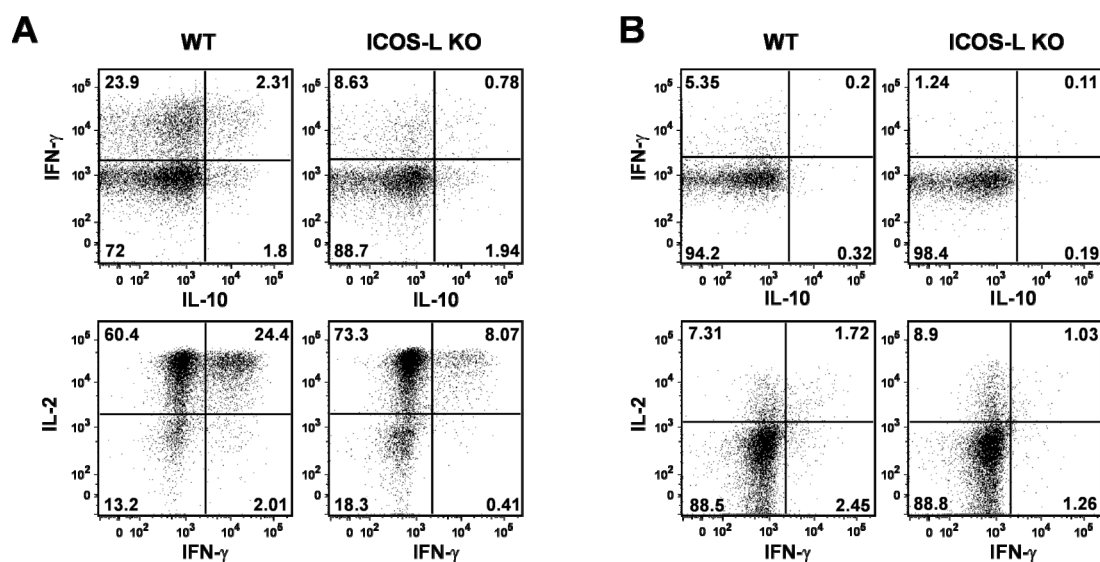


Abb. 22: Zytokinexpression von Antigen-spezifischen T-Zellen

Adoptiver Transfer Antigen-spezifischer T-Zellen mit nachfolgender lokaler Immunisierung. Durchflusszytometrische Analyse der drainierenden LN von WT und ICOS-L KO Rezipienten 5 Tage nach Immunisierung. Die isolierten Zellen wurden für 4,5 h mit A) PMA/Ionomycin oder B) OVA-Peptid₃₂₃₋₃₃₉ *in vitro* stimuliert. Die Zahlen in den Quadranten geben den Prozentsatz bezogen auf alle CD4⁺Thy-1.1⁺ T-Zellen an. Angegeben ist die Frequenz bezogen auf alle transgenen T-Zellen. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Experiment von drei.

IL-2 stellt einen wichtigen Überlebensfaktor für Regulatorische T-Zellen dar. In verschiedenen Publikationen wurde gezeigt, dass T-Zellen von ICOS KO und ICOS-L KO Mäusen nach *in vitro* Stimulation ihre Fähigkeit IL-2 zu produzieren komplett verlieren oder diese zumindest reduziert war (Dong et al. 2001a; Nurieva et al. 2003b). Im Gegensatz dazu zeigten sowohl mit PMA/Ionomycin als auch mit OVA-Peptid restimulierte Antigen-spezifische T-Zellen eine absolut vergleichbare IL-2 Expression (Abb. 22A, B). Mit Hilfe eines variierten Experimentaufbaus sollte diese Aussage auch für einen T-Zellpool bestätigt werden, der bereits Memory T-Zellen enthält.

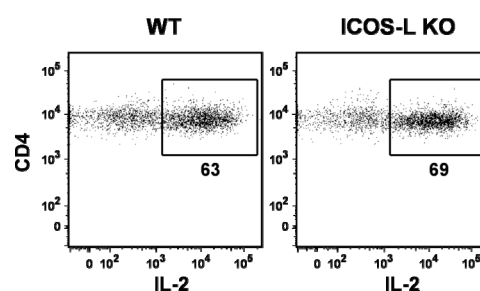


Abb. 23: IL-2 Expression Antigen-spezifischer Zellen

Zytokin Sekretions Assay für IL-2. Durchflusszytometrische Analyse Antigen-spezifischer T-Zellen nach adoptivem Transfer und lokaler Immunisierung. Präparation der drainierenden LN von WT und ICOS-L KO Rezipienten 14 h nach Immunisierung. Die gleiche Aussage wurde bei der Präparation 6, 24, und 48 h nach Immunisierung erhalten. Angegeben ist die Frequenz bezogen auf alle transgenen T-Zellen. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Experiment von drei.

Dazu wurden OT-II T-Zellen (ohne CD62L^{high} MACS Sortierung) in WT oder ICOS-L KO Rezipienten transferiert, 14 h nach der Immunisierung reisoliert und direkt ohne *in vitro* Restimulation mittels Zytokin Sekretions Assay auf IL-2 vermessen (Abb. 23). In beiden Gruppen sezernierten um die 65% aller Thy-1.1⁺ T-Zellen IL-2. Auch 6, 24 und 48 h nach der Immunisierung war der Anteil der IL-2 produzierenden transgenen Zellen vergleichbar. Ähnliche Experimente für IFN- γ , IL-4 und IL-10 führten aufgrund zu geringer Zytokinsekretion zu keinen verwertbaren Ergebnissen (Daten nicht gezeigt).

3.12 Auf der Suche nach dem Mechanismus

3.12.1 Untersuchung von ausgewählten Überlebensfaktoren

Im Vergleich zu $CD8^+$ T-Zellen ist relativ wenig bekannt über Faktoren, die das Überleben von $CD4^+$ T-Zellen regulieren. Dennoch existieren einige Moleküle die wichtige Schlüsselrollen einnehmen. OX-40 und 4-1BB regulieren zum Beispiel das Überleben von T-Zellen und deren Expansion (Bansal-Pakala et al. 2001; Kwon et al. 2002). IL-7 agiert als Wachstumsfaktor für T-Zellen, dessen biologischer Effekt durch die Expression des Rezeptors limitiert wird (Peschon et al. 1994).

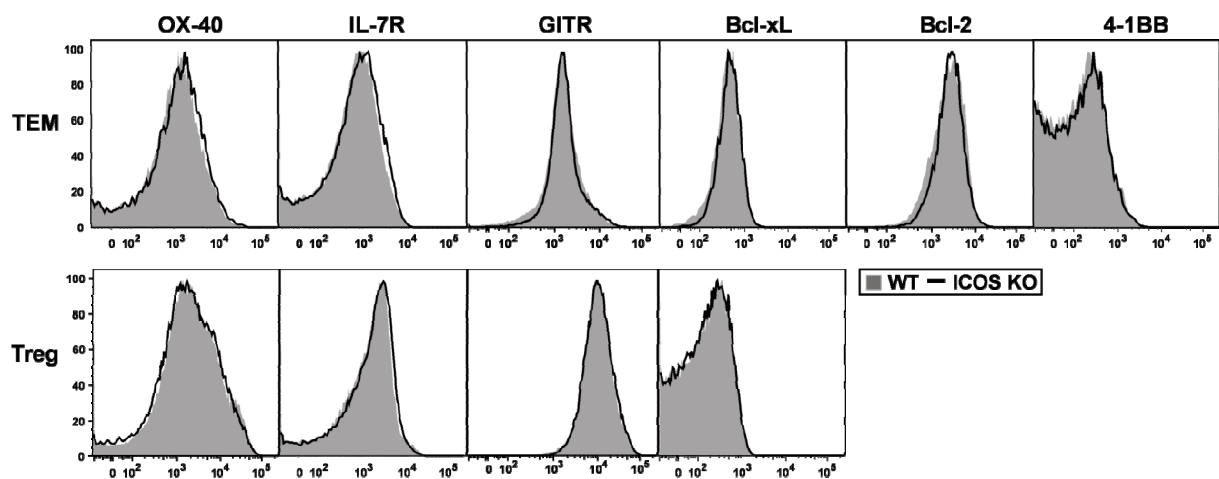


Abb. 24: Überlebensmarker auf Effektor-Memory und Regulatorischen T-Zellen

Expression diverser Überlebensmarker auf Regulatorischen (Treg, $FoxP3^+$) und Effektor-Memory (TEM, $FoxP3^-$ $CD62L^{low}CD44^{high}$) T-Zellen. Definition der Populationen wie in Abbildung 6. Durchflusszytometrische Analyse von WT (ausgefülltes graues Histogramm) und ICOS KO Splenozyten (schwarzes Histogramm). Gezeigt ist eins von zwei Experimenten.

GITR wird vorzugsweise auf Regulatorischen T-Zellen exprimiert und kann diese zugunsten von Effektorzellen supprimieren (Shimizu et al. 2002). Bcl-xL und Bcl-2 gehören zur Gruppe der anti-apoptotischen Proteine und Fas (CD95) besitzt die Möglichkeit über eine intrazelluläre Todesdomäne Apoptosesignale in die Zellen weiterzuleiten (Boldin et al. 1995).

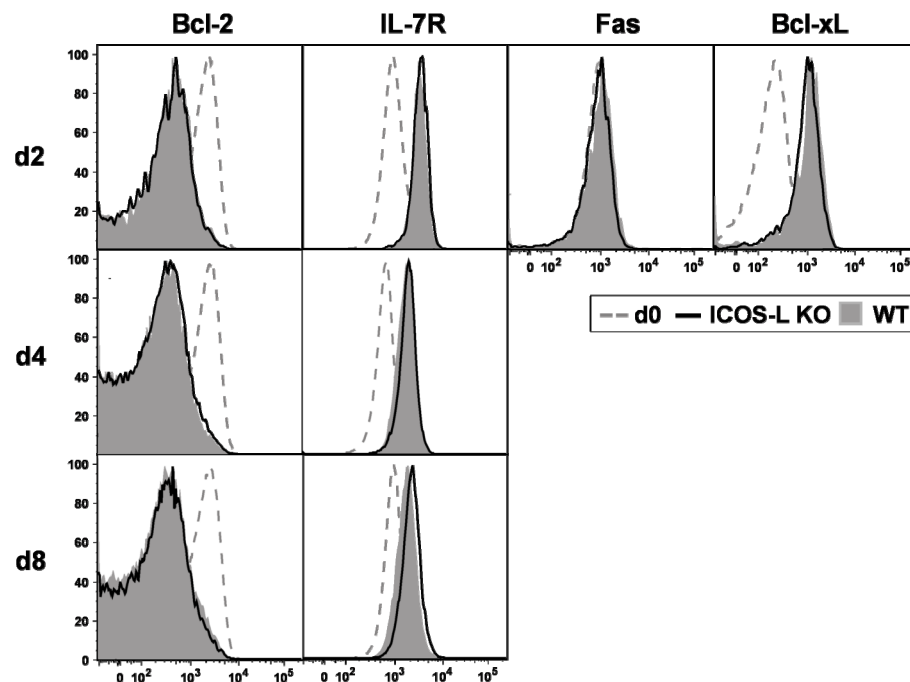


Abb. 25: Überlebensmarker auf Antigen-spezifischen T-Zellen

Adoptiver Transfer von OVA-spezifischen Zellen und lokale Immunisierung. Durchflusszytometrische Analyse der drainierenden LN von WT (ausgefülltes graues Histogramm) und ICOS-L KO (schwarzes Histogramm) Rezipienten an Tag 2, 4 und 8. Die Histogramme zeigen die Färbung der Thy-1.1⁺ T-Zellen auf verschiedene Überlebensmarker. Als Kontrolle ist zusätzlich Tag 0 gezeigt (gestrichelte Linie). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei.

Die Effektor-Memory und Regulatorischen T-Zellen unbehandelter Mäuse sowie aktivierte Antigen-spezifische T-Zellen wurden auf die Expression solcher Schlüsselfaktoren untersucht. Es konnten jedoch weder für ICOS KO Mäuse noch für die Antigen-spezifischen T-Zellen in ICOS-L KO Rezipienten Unterschiede gefunden werden (Abb. 24 und 25).

3.12.2 Etablierung einer Sortierungsstrategie für transgene T-Zellen

Mit Hilfe von Genarray-Analysen sollten nun die Gene ausfindig gemacht werden, deren Regulation in Folge der fehlenden ICOS-Kostimulation beeinflusst wird. Dies erforderte die vorangehende saubere Isolierung der transgenen T-Zellen aus den Zellen der drainierenden LN von WT und ICOS-L KO Rezipienten. Drei verschiedene Herangehensweisen wurden auf Reinheit, Ausbeute und Aufwand getestet: A) Die Sortierung von Thy-1.1⁺ T-Zellen mittels magnetischer Zellsortierung (MACS) führte zu einer 14-20 fachen Anreicherung der Zielzellpopulation, jedoch auch von unerwünschten autofluoreszenten und toten Zellen (Abb. 26A).

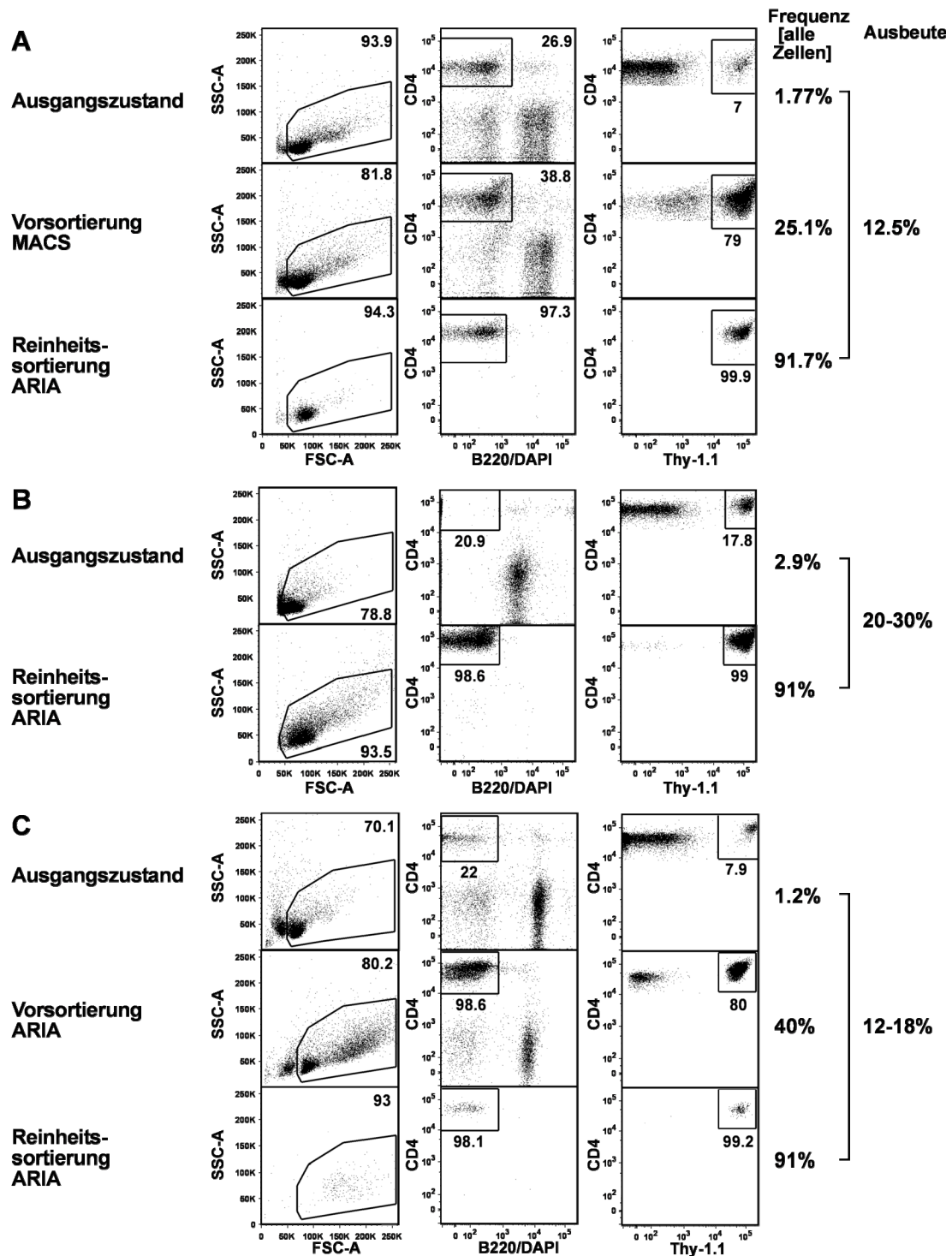


Abb. 26: Sortierungsstrategien von transgenen T-Zellen

Sortierung von transgenen T-Zellen mittels MACS und/oder Durchflusszytometrie nach adoptivem Transfer. 24, 48 oder 72 h nach Immunisierung erfolgte die Entnahme der drainierenden LN. Gezeigt ist die durchflusszytometrische Analyse des Zellgemisches vor der Sortierung und nach jedem Anreicherungsschritt. A) Magnetische Vorsortierung der Thy-1.1⁺ Zellen durch Färbung der Zellen mit einem anti-Thy-1.1-Bio Antikörper sowie anti-Biotin-Beads. Anschließend Reinheitsortierung am BD FACSARIA™. B) Direkte durchflusszytometrische Sortierung der Zellen am BD FACSARIA™ ohne vorherige Anreicherung. C) Grobe

Vorsortierung am BD FACSAria™ im *Yield*-Modus mit darauffolgender Reinheitssortierung. Die Sortierungsparameter für den ARIA waren: B220⁻CD4⁺Thy-1.1⁺TZRVα2⁺ Zellen. Die Zahlen innerhalb der Plots beziehen sich auf das jeweilige vorherige Gate. Rechts sind zusätzlich die Frequenzen bezogen auf alle Zellen und die Ausbeuten angegeben.

Mittels nachfolgender Reinheitssortierung an einem Zellsortierungsgerät (BD FACSAria™) wurde eine ca. 92%ige reine CD4⁺Thy-1.1⁺ Population erhalten. B) Die direkte durchflusszytometrische Sortierung lieferte Zellsuspensionen transgener T-Zellen mit Reinheiten von 79-91% (Abb. 26B und Daten nicht gezeigt). C) Mittels grober Vorsortierung an einem Zellsortierungsgerät (BD FACSAria™) konnten die Zielzellen auf das 28 bis 35fache angereichert werden, ohne zusätzlich unerwünschte Zellpopulationen zu erhöhen. Die darauffolgende sehr kurze Reinheitssortierung (BD FACSAria™) lieferte eine 91–98% reine Zielzellpopulation (Abb. 26C und Daten nicht gezeigt). Die letzte Methode erzielte somit bei geringstem Zeitaufwand eine gleichbleibend hohe Reinheit. Die Ausbeute wird durch eine zweifache durchflusszytometrische Sortierung keineswegs begünstigt, trotzdem stellte die Vorsortierung mittels BD FACS Aria™ mit einer verlässlichen Reinheit und einer Ausbeute von bis zu 18% einen guten Kompromiss dar.

3.12.3 Die Expression immunologisch relevanter Gene wird von ICOS nicht beeinflusst

Die aus den transgenen T-Zellen der WT und ICOS-L KO Rezipienten gewonnene RNA wurde auf insgesamt ca. 800 immunologisch relevante oder für die Apoptose wichtige Gene mit Hilfe von TaqMan Arrays getestet. Die RNA Isolierung erfolgte aus transgenen Zellen jeweils 24, 48 und 72 h nach der Immunisierung. Diese Zeitpunkte wurden gewählt, da sie den Bereich der maximalen ICOS-Expression abdecken. Bei der Auswertung fiel keines der getesteten Gene durch eine auffällig veränderte Regulation auf (Abb. 27A, B). Kleine Unterschiede, die auftraten wurden geprüft, mußten aber aufgrund der minimalen Genexpressionen vernachlässigt werden.

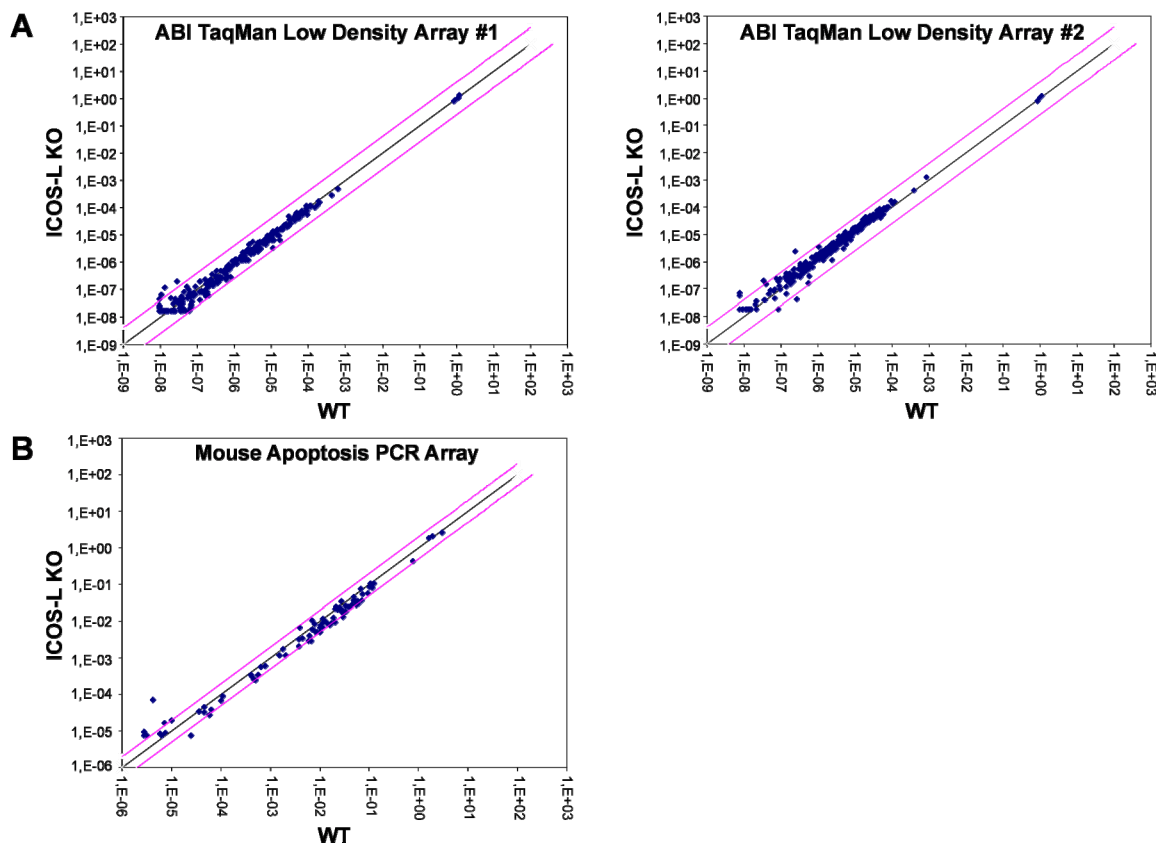


Abb. 27: Durchführung von TaqMan-Arrays

Messung der RNA-Expression von ca. 800 Genen mittels Real Time PCR. Die RNA-Isolierung erfolgte aus rein sortierten Thy-1.1⁺ T-Zellen der WT und ICOS-L KO Versuchsgruppe nach adoptivem Transfer, 48 h nach Immunisierung. A) TaqMan Low Density Arrays (ABI) mit jeweils 380 Genen von immunologischer Relevanz. B) Das Mouse Apoptosis RT² ProfilerTM PCR Array (SuperArray) beinhaltet 84 Gene, welche beim programmierten Zelltod involviert sind. In den Scatter Plots ist die n-fache Expressionsveränderung $c_{t \text{ normalisiert}}(\text{KO})/c_{t \text{ normalisiert}}(\text{WT})$ aufgetragen. Die Normalisierung der c_t Werte erfolgte auf 18s RNA. Zur Orientierung zeigt die schwarze Linie die n-fache Expressionsveränderung ($2^{(-\Delta\Delta c_t)}$) von 1 und die rosa Linien eine 4-fache Expressionsveränderung. Die gleichen Ergebnisse wurden mit RNA, die 24 und 72 h nach Immunisierung isoliert wurde, erhalten.

3.13 Für zytotoxische CD8⁺ T-Zellen nimmt die Kostimulation über ICOS einen anderen Stellenwert ein

3.13.1 Die ICOS Expression von Effektor-Memory CD8⁺ T-Zellen beeinflusst nicht deren Populationsgröße

Auch CD8⁺ T-Zellen exprimieren ICOS. Im Vergleich mit CD4⁺ T-Zellen (siehe Abb. 6) sind es allerdings nur ca. 1,2% aller CD8⁺ T-Zellen, die ICOS auf hohem Niveau exprimieren (Abb. 28). Eine Analyse der CD8⁺ T-Zellsubpopulationen sollte zeigen, wie diese ICOS^{high} T-Zellen innerhalb der CD8⁺ Populationen verteilt sind. Dazu wurde das in 3.2 angewendete Markersystem genutzt.

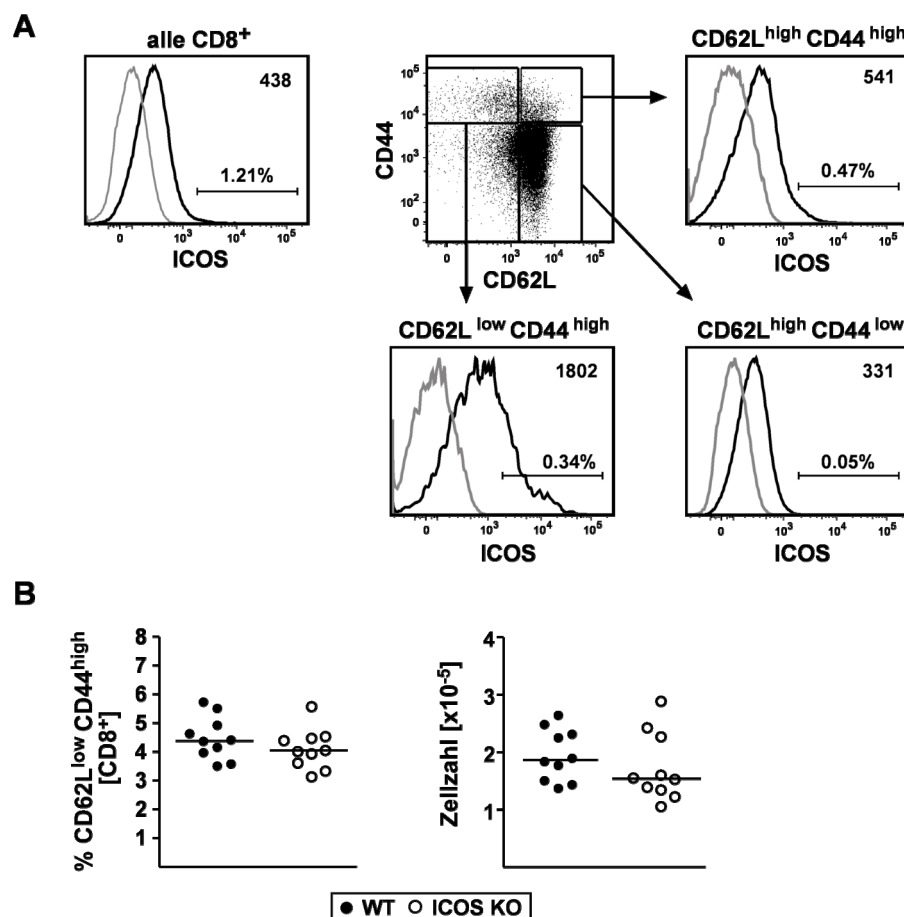


Abb. 28: ICOS-Expression auf CD8⁺ T-Zellsubpopulationen und Populationsanalyse

Analyse der CD8⁺ T-Zellsubpopulationen ausgehend von MHCII⁻DAPI⁻CD3⁺ Zellen: Effektor-Memory (CD62L^{low}CD44^{high}), *Central-Memory* (CD62L^{high}CD44^{high}) und naive (CD62L^{high}CD44^{low}) T-Zellen. FoxP3⁺ CD8⁺ T-Zellen wurden nicht näher untersucht, da die Frequenz < 0,2% betrug. A) Färbung der peripheren LN-

Zellen von WT (schwarzes Histogramm) und ICOS KO Mäusen (graues Histogramm, Spezifitätskontrolle). In jedem Diagramm ist die MFI und die Frequenz bezogen auf alle $CD8^+$ T-Zellen gezeigt, um die Verteilung der $ICOS^{high}$ Zellen innerhalb der T-Zellpopulationen zu verdeutlichen. B) Statistische Analyse der Frequenzen der Effektor-Memory T-Zellen bezogen auf alle $CD8^+$ Zellen und absolute Zellzahl. Gezeigt sind LN-Zellen von WT (geschlossene Kreise) und ICOS KO (offene Kreise) Tieren. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt vier.

FoxP3 ist für $CD8^+$ T-Zellen kaum nachweisbar ($< 0,2\%$ von $CD8^+$) und wurde daher nicht berücksichtigt. Zellen mit Effektor-Memory Phänotyp ($CD62L^{low}CD44^{high}$) besitzen ein mittleres ICOS-Expressionsniveau (Abb. 28A), ähnlich den $CD4^+$ *Central-Memory* T-Zellen. Im Vergleich dazu wird ICOS von naiven ($CD62L^{high}CD44^{low}$) und *Central-Memory* ($CD62L^{high}CD44^{high}$) $CD8^+$ T-Zellen nur auf basalem Level exprimiert. Überraschenderweise zeigten ICOS KO Mäuse keinerlei signifikante Veränderungen in Bezug auf die Frequenz von $CD8^+$ Effektor-Memory T-Zellen (Abb. 28B). Auch andere T-Zellsubpopulationen waren nicht verändert (Daten nicht gezeigt).

3.13.2 Die Proliferation transgener $CD8^+$ T-Zellen ist von ICOS unabhängig

In einem OVA-spezifischen Transfersystem sollte der Einfluss von ICOS auf die Expansion der $CD8^+$ T-Zellen geprüft werden. Dazu wurden OVA-TZR-transgene $Thy-1.1^+CD8^+$ T-Zellen aus OT-I Mäusen jeweils in WT und ICOS-L KO Rezipienten durch Antigenpräsentation über MHC I aktiviert, äquivalent zum beschriebenen adoptiven OT-II Transfersystem. Die $CD8^+$ T-Zellen proliferierten bei geringerer Antigengabe wesentlich stärker als $CD4^+$ T-Zellen. So waren an Tag 4 ca. 26% aller $CD8^+$ T-Zellen $Thy-1.1^+$. Diese transgenen Zellen haben sich dann bereits bis zu neun mal geteilt. Die Untersuchung WT vs. ICOS-L KO führte zu folgenden Ergebnissen: Sowohl die Zahl an transgenen Zellen (Abb. 29A, B), die Proliferation (Abb. 29A, C) und die Aktivierung (Daten nicht gezeigt) wurden bis Tag 14 nach der Immunisierung nicht durch fehlende ICOS Kostimulation beeinträchtigt. Geringere Antigenmengen führten zu den gleichen Ergebnissen (Daten nicht gezeigt).

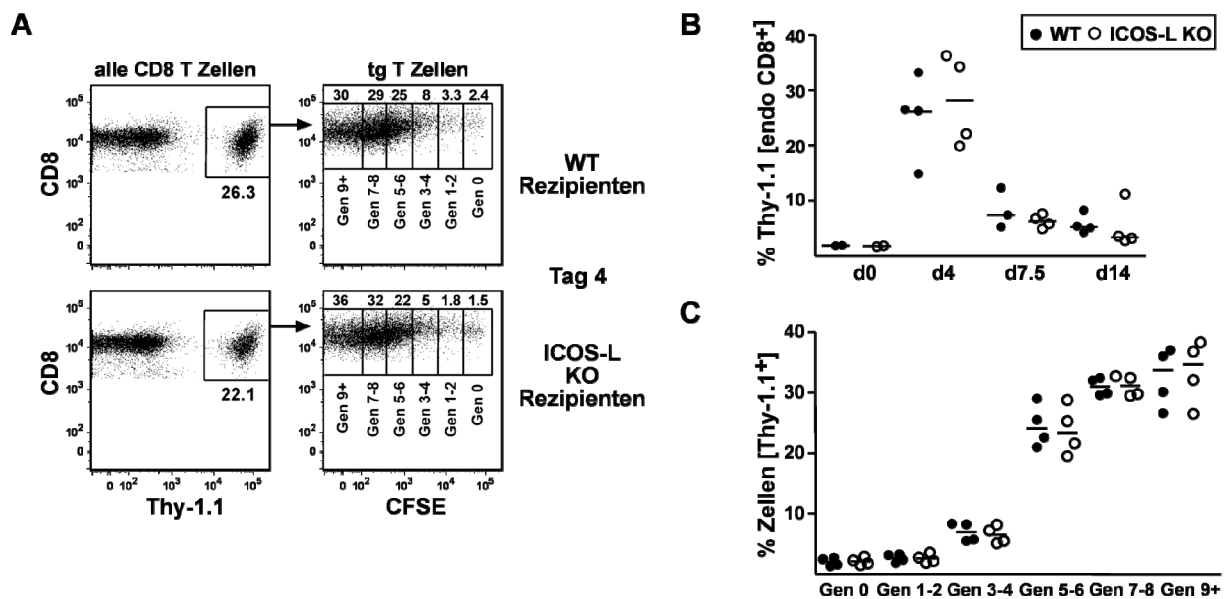


Abb. 29: Expansion Antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen

OVA-spezifische OT-I Zellen wurden CFSE markiert und in WT oder ICOS-L KO Rezipienten transferiert. Analyse der drainierenden LN 4 Tage nach Immunisierung. A) Die Färbung zeigt das Gating auf die Thy-1.1⁺CD8⁺ T-Zellen (ausgehend von B220⁻DAPI⁻ Zellen) sowie die Unterteilung der Thy-1.1⁺ T-Zellen in verschiedene Generationen basierend auf der CFSE Intensität. Die Zahlen zeigen die Frequenz der transgenen Zellen bezogen auf alle CD8⁺ T-Zellen bzw. die Verteilung der Generationen innerhalb der transgenen CD8⁺ T-Zellen. B) Graphische Auswertung der transgenen T-Zellfrequenzen bezogen auf alle endogenen CD8⁺ T-Zellen. C) Generationsverteilung innerhalb der transgenen CD8⁺ T-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt zwei.

3.13.3 Der Einfluss von ICOS auf die Expansion der CD8⁺ T-Zellen durch homöostatische Proliferation

Mit Hilfe des in 3.9 bereits beschriebenen Systems der homöostatischen Proliferation von polyklonalen T-Zellen, sollte erneut ein möglicher Einfluss von ICOS auf die Expansion und das Überleben von CD8⁺ T-Zellen studiert werden. Für die ICOS-L KO und WT Gruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Gesamtzahl an Thy-1.1⁺CD8⁺ T-Zellen (Abb. 30A, B). Mehr als 80% der CD8⁺ T-Zellen teilten sich nicht. Während die ungeteilte Fraktion in WT und ICOS-L KO Rezipienten absolut gleich war, findet sich jedoch ein signifikanter Unterschied der geteilten Population in den KO Rezipienten.

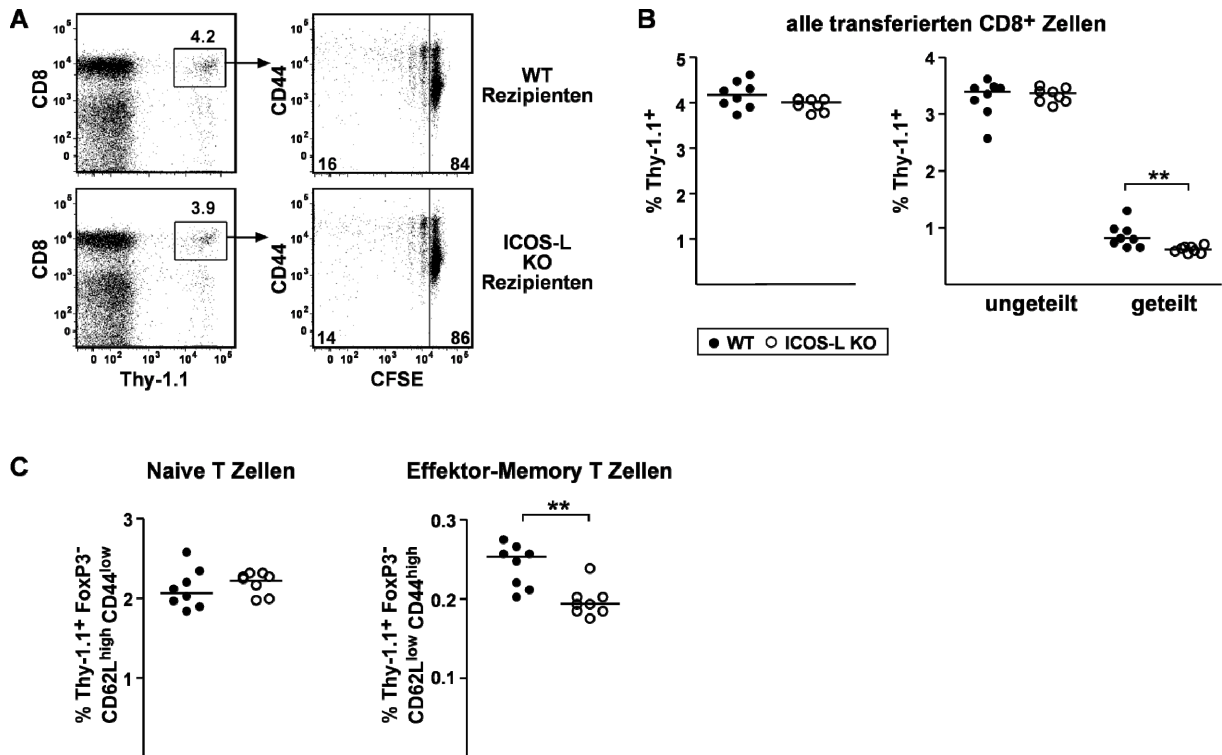


Abb. 30: Homöostatische Proliferation von CD8⁺ T-Zellen

CFSE Markierung und Transfer von 25×10^6 LN Zellen aus B6.PL Mäusen (Thy-1.1⁺) in WT oder ICOS-L KO Rezipienten (Thy-1.2⁺). Die durchflusszytometrische Analyse der peripheren LN der Rezipientenmäuse erfolgte an Tag 20. A) Repräsentative Färbung ausgehend von MHCII⁺DAPI⁺ Zellen, welche den CFSE Gehalt aller transferierten Thy-1.1⁺CD8⁺ T-Zellen zeigt. B) und C) Frequenzen der transferierten Zellen in Bezug auf die CD8⁺ T-Zellen der Rezipienten für B) alle transferierten T-Zellen und C) verschiedene T-Zellsubpopulationen. Die Gatingstrategie erfolgte wie in Abb. 5. Gezeigt ist eines von vier (B) und zwei (C) Experimenten.

Die genaue Analyse ergab eine selektive Reduktion der Effektor-Memory CD8⁺ T-Zellen (Abb. 30C). Dieses Ergebnis bestätigt nicht das Bild der vorangegangenen Experimente. Obwohl die Pool-Größe der Effektor-Memory CD8⁺ T-Zellen in ICOS KO und WT Mäusen gleich war und die CD8⁺Thy-1.1⁺ T-Zellen in den ICOS-L KO Rezipienten durch das Fehlen von ICOS nicht beeinträchtigt wurden, kann ein Einfluss von ICOS auf die Expansion oder das Überleben der CD8⁺ T-Zellen nicht ausgeschlossen werden.

4 Diskussion

4.1 ICOS steuert die Populationsgröße von Effektor-Memory und Regulatorischen CD4⁺ T-Zellen

2001 wurden die ersten ICOS defizienten Mäuse in der Literatur beschrieben (Dong et al. 2001a; McAdam et al. 2001; Tafuri et al. 2001). Die Tiere zeigten keinerlei Auffälligkeiten in Bezug auf ihre Lymphozytenpopulationen. Erst das Studium von ablaufenden Immunantworten machte deutlich, dass ihre T-Zell Effektorantwort beeinträchtigt schien (Dong et al. 2001a). Mit der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung von ICOS KO Mäusen wurde bestätigt, dass der prozentuale Anteil und die absolute Zellzahl von T-, B- und Dendritischen Zellen unverändert bleibt. Eine detaillierte Untersuchung der T-Zellsubpopulationen zeigte jedoch erstmals, dass unbehandelte ICOS KO Mäuse bereits bis zu 50% weniger Effektor-Memory T-Zellen besitzen. Auch in ICOS-L KO Mäusen, deren Phänotyp dem der ICOS KO Mäuse entspricht (Mak et al. 2003; Nurieva et al. 2003b), konnte dieser Defekt in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden. Neben Memory T-Zellen sind die Regulatorischen T-Zellen in ihrer Frequenz ebenfalls sehr stark reduziert. Während die Kostimulation über CD28 nicht nur für die Homöostase, sondern insbesondere für eine effiziente Generierung von Regulatoren im Thymus absolut notwendig ist (Tai et al. 2005; Tang et al. 2003), konnte klar gezeigt werden, dass FoxP3⁺ Thymozyten in ICOS KO und WT Mäusen keine Unterschiede aufweisen. ICOS spielt demnach im Gegensatz zu CD28 ausschließlich eine Rolle für die Homöostase der Regulatorischen T-Zellen in der Peripherie.

4.2 Überlebenskomponente ICOS – Der Einfluss auf das Leben einer Effektor T-Zelle

In frühen *in-vitro* Studien wurde beschrieben, dass die Blockade des ICOS-ICOS-L Signals die Proliferation von aktivierten T-Zellen (Yoshinaga et al. 1999) und die Zytokinproduktion von Effektor T-Zellen (Coyle et al. 2000) negativ beeinflusst. Die Kostimulation mit Antikörpern gegen ICOS oder ICOS-L Fusionsproteinen führte dagegen zu positiven Effekten auf Proliferation und Zytokinproduktion (Hutloff et al. 1999; McAdam et al. 2000; Wang et al. 2000; Yoshinaga et al. 1999). Auch mehrere *in vivo* Studien zeigten einen Effekt der ICOS Kostimulation auf die T-Zellaktivierung (Gonzalo et al. 2001; Smith et al. 2003). Diese

Studien sind jedoch aufgrund der experimentellen Durchführung schwierig zu deuten, denn unerwünschte Effekte von blockierenden Antikörpern oder Fusionsproteinen wie Depletion, partielle Kostimulation und andere Fc-vermittelte Effekte können nicht ausgeschlossen werden. Nachfolgende Studien mit ICOS oder ICOS-L KO Mäusen kamen zu dem Ergebnis, dass insbesondere die frühen Phasen der Immunantwort wie Proliferation und Aktivierung von Oberflächenmolekülen (CD40L, CD25 und CD69) ICOS-abhängig sind (Dong et al. 2001a; Tafuri et al. 2001). Dagegen konnten ähnliche Studien diese Wirkung auf die Proliferation (Mak et al. 2003; McAdam et al. 2001) und das Überleben der CD4⁺ T-Zellen (Mak et al. 2003) nicht bestätigen. Ein Grundproblem aller in der Literatur beschriebenen Experimente ist, dass es nicht möglich war, einzelne T-Zellen auf ihrem Weg von der Aktivierung über die Differenzierung bis hin zur Apoptose zu verfolgen. Wichtige Information können so aber verlorengehen, denn eine T-Zellpopulation, welche zu 50% reduziert, aber vollständig aktiviert ist, kann nicht von einer Population unterschieden werden, die einfach nur zur Hälfte aktiviert ist. Mit Hilfe des in dieser Arbeit genutzten adoptiven Transfersystems war es nun erstmals möglich, den Beitrag von ICOS zur Aktivierung, Differenzierung und Apoptose präzise zu definieren.

Für die dargestellten Experimente erfolgte stets der Transfer von Antigen-spezifischen WT T-Zellen in WT und ICOS-L KO Rezipienten. Dieser Experimentaufbau ist von entscheidendem Vorteil, da den beiden Versuchsgruppen exakt die gleichen Donorzellen injiziert werden können. Alternativ wurden auch Antigen-spezifische ICOS KO bzw. WT T-Zellen in WT Rezipienten transferiert. Dies hat jedoch experimentell einige Nachteile, denn die Antigen-spezifischen WT und ICOS KO Splenozyten besitzen nicht die gleiche Zusammensetzung. Auch durch die CD62L^{high} Sortierung war es praktisch unmöglich eine identische Zusammensetzung der Zellpopulationen zu erhalten; insbesondere der Anteil an FoxP3⁺ Zellen variierte. Die verringerte Population an Regulatorischen T-Zellen im ICOS-L KO Rezipienten stellt wiederum einen Nachteil beim Transfer von Antigen-spezifischen WT T-Zellen in WT und ICOS-L Rezipienten dar. Die geringere Zahl FoxP3⁺ T-Zellen könnte die Aktivierung und/oder die Expansion der transferierten Zellen durchaus beeinflussen. Für alle Experimente wurden deshalb beide Ansätze verfolgt. Da beide Möglichkeiten zu einem ähnlichen Ergebnis führten, werden die Daten des Transfers von ICOS KO Mäusen in WT Rezipienten nicht gezeigt.

Im Gegensatz zu den in der Literatur publizierten Daten konnte gezeigt werden, dass der frühe Aktivierungsstatus aller Antigen-spezifischen T-Zellen nicht von der ICOS Kostimulation

abhängig ist. Stattdessen wurde nachgewiesen, dass ICOS das Überleben von aktivierten Effektor sowie ruhenden Memory T-Zellen steuert. Insbesondere T-Zellen der späten Immunantwort, welche bereits länger in Kontakt mit dem Antigen standen, waren signifikant beeinflusst. Verglichen mit *in vitro* Kulturen war in dem *in vivo* Transfer-System der Anteil an früh-apoptotischen Antigen-spezifischen T-Zellen relativ gering. Da apoptotische Zellen jedoch sehr rasch von den phagozytischen Zellen des Organismus eliminiert werden, stellt eine lediglich verdoppelte Apoptoserate *in vivo* durchaus die Ursache für die minimierte Population der Effektor T-Zellen dar. In Hinsicht dieser Funktion ist ICOS dem Kostimulator OX-40, einem Mitglied der TNFR Familie, sehr ähnlich. Rogers beschrieb, dass OX-40 defiziente CD4⁺ T-Zellen, die mit Peptid stimuliert wurden, bis zum Tag 3 völlig normal proliferieren (Rogers et al. 2001). Während sich das Fehlen von CD28 bereits vom Beginn der Immunantwort auf die Proliferation auswirkte, beeinflusste OX-40 nachweislich nur die Teilung späterer Generationen und das Langzeitüberleben der T-Zellen. Die Ursache hierfür wird im Zusammenhang mit der reduzierten Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-xL und Bcl-2 gesehen (Rogers et al. 2001; Salek-Ardakani und Croft 2006).

Ob ICOS zusätzlich noch die T-Zellproliferation reguliert, ist schwierig zu beurteilen. 2003 beschrieben Smith und Kollegen ein Experiment, welches diese Frage beantworten sollte (Smith et al. 2003). BALB/c Tieren wurden OVA-spezifische T-Zellen transferiert. Die Behandlung mit anti-ICOS Antikörper führte äquivalent zu den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen zu einer reduzierten Anzahl der Antigen-spezifischen T-Zellen 3 Tage nach der Immunisierung. Der Effekt konnte von Smith nicht auf ein verändertes Proliferationsmuster zurückgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit war der BrdU Einbau minimal reduziert. Der kumulative Effekt des beobachteten, jedoch nicht signifikanten Unterschiedes könnte durchaus nach mehreren Zellteilungszyklen biologisch relevant werden. Die Intensität des BrdU-Signals war dahingegen zum gleichen Zeitpunkt für beide Versuchsgruppen identisch. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass nicht die DNA-Syntheserate, sondern die Wahrscheinlichkeit einer Zelle in den Teilungszyklus einzutreten von ICOS zu einem gewissen Maße beeinflusst wird. Diese Interpretation würde auch die geringfügig erhöhte Zahl an T-Zellen in der G_{0/1}-Phase erklären. Alternativ kann auch davon ausgegangen werden, dass der Unterschied innerhalb der BrdU⁺ Fraktion auf das Sterben der T-Zellen während des BrdU-Pulses zurückzuführen ist. Insgesamt scheint der Beitrag, den ICOS zur Proliferation der T-Zelle leistet, aber eher klein im Vergleich mit der potenten Wirkung von CD28 zu sein. So ist in den vergangenen Jahren deutlich geworden, dass die Kostimulation über CD28-

CD80/86 für die korrekte Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3) ganz entscheidend ist (Garcon et al. 2008; Strainic et al. 2008). Diese trägt wiederum zur Expression von Bcl-xL und damit zum Überleben der T-Zellen bei (Burr et al. 2001; Wu et al. 2005). Auch ICOS spielt eine wesentliche, wenn nicht sogar wichtigere Rolle für die PI3-Kinase Aktivität (Parry et al. 2003). Eine spezifische Wirkung für den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus wurde bisher aber nur für CD28 publiziert. Song und Arbeitskollegen identifizierten die Kinase Aurora B im Komplex mit Survivin und mTOR (*mammalian target of rapamycin*) als Regulator des G₁/S-Kontrollpunktes einer T-Zelle (Song et al. 2007).

Die Mehrzahl an früheren Studien verschiedenster Krankheitsmodelle bestätigt den in der vorliegenden Arbeit beobachteten Beitrag von ICOS zur Expansion der Effektor und Memory T-Zellen. Die proinflammatorische Rolle von ICOS während der späten Effektorphase oder der sekundären T-Zell-abhängigen B-Zellantwort wurde wiederholt demonstriert. So führt die Infektion mit *Trichuris muris* im Mausmodell zur Entwicklung einer polarisierten Th2-Antwort (Cliffe und Grencis 2004; Grencis 1993). Während in WT Mäusen 18 Tage nach der Infektion bereits alle Würmer eliminiert waren, scheiterten ICOS defiziente Mäuse daran ausreichend IgG1 und IgE zu produzieren und entwickelten erst verspätet eine erfolgreiche Immunantwort (Wilson et al. 2006). Die Infektion mit *Toxoplasma gondii* bewirkt dagegen die Differenzierung zu Th1 Zellen um die Replikation des intrazellulären Parasiten zu stoppen (Aliberti 2005). Auch in diesem Fall konnte nachgewiesen werden, dass die fehlende ICOS Kostimulation die Expansion der CD44^{high}CD62L^{low}CD4⁺ T-Zellen entscheidend beeinträchtigt (Wilson et al. 2006). Dies lässt vermuten, dass ICOS unabhängig von der Polarisierung einer T-Zellantwort die Populationsgröße von Effektor Zellen steuert.

4.3 Hilfe für B-Zellen – Die ICOS Kostimulation unterstützt Follikuläre T-Helferzellen

Die Interaktion von ICOS-ICOS-L spielt eine entscheidende Rolle für die Regulation der humoralen Immunität und der Keimzentrumsreaktionen (Dong und Nurieva 2003). Akiba und Kollegen beobachteten, dass die Blockade dieses Signalweges die Generierung der Follikulären B-Helfer T-Zellen (TFH) ganz empfindlich beeinflusst (Akiba et al. 2005). Auch humane ICOS-Defizienz Patienten besaßen eine deutlich reduzierte Population an TFH-Zellen (Bossaller et al. 2006). Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen bestätigten die in der Literatur beschriebenen Daten; sowohl ICOS KO als auch ICOS-L KO Mäuse generieren

kaum TFH. Auch im adoptiven Transfersystem war die Population 6 Tage nach Beginn der Immunantwort stark reduziert. Der Mechanismus, anhand welchem ICOS die Entwicklung der TFH reguliert ist immer noch nicht ganz verstanden. Es eröffnen sich jedoch einige sehr interessante Konzepte aus den kürzlich in der Literatur beschriebenen Daten. IL-21, welches ausschließlich von aktivierten CD4⁺ und NK T-Zellen sezerniert wird (Coquet et al. 2007; Leonard und Spolski 2005), scheint dabei eine ganz besondere Rolle zu spielen. So führte bereits ein fehlerhafter Repressor für ICOS zu einer überhöhten Zahl an CXCR5⁺ T-Zellen und zur IL-21 Überproduktion (Vinuesa et al. 2005; Yu et al. 2007). Des Weiteren exprimierten ICOS defiziente Splenozyten, stimuliert mit anti-CD3 weniger IL-21 mRNA und Protein (Vogelzang et al. 2008). Kim und Arbeitskollegen konnten zeigen, dass die IL-21 Expression durch Signalwege via Calcium und NFAT Faktoren reguliert wird (Kim et al. 2005), während Nurieva und Kollegen beschrieben, dass ICOS gemeinsam mit CD28 und dem T-Zellrezeptor die Expression von NFATc1 über einen PI3 Kinase Calcium Signalweg erhöht (Nurieva et al. 2003a; Nurieva et al. 2007). Es liegt somit nahe, dass ICOS die Expression von IL-21 steuert und damit auch die TFH Entwicklung. TFH-Zellen sezernieren nicht nur IL-21, sie koexprimieren auch den Rezeptor für IL-21 (Chtanova et al. 2004). Interessant ist, dass IL-21 sehr wahrscheinlich einen autokrinen Wachstumsfaktor für TFH Zellen darstellt, denn IL-21 defiziente Mäuse entwickeln ebenfalls einen Defekt in Bezug auf die Generierung von TFH (Vogelzang et al. 2008). Auf humanen CXCR5^{high}PD-1^{high} T-Zellen wird der Rezeptor von IL-21 besonders stark exprimiert (Vogelzang et al. 2008). Dieser Befund lässt sich sehr gut in die hier gezeigten Daten eingliedern, denn insbesondere die murinen CXCR5^{high}PD-1^{high} T-Zellen waren es, die in mehreren Analysen durch die fehlende ICOS Kostimulation beeinträchtigt wurden. Die Blockade mittels anti-PD-1 Antikörper beeinflusste die Entwicklung der TFH Zellen nicht. Dies weist darauf hin, dass zwischen PD-1 und IL-21R kein funktioneller Zusammenhang besteht, sondern dass die Regulation der TFH-Population sehr wahrscheinlich über die mit PD-1 untrennbar verbundene IL-21R Expression erfolgt. In einem Experiment von Nurieva wurde gezeigt, dass IL-21 die Proliferation von CXCR5⁺ T-Zellen stimuliert und die Apoptose reduziert (Nurieva et al. 2008). Zusammenfassend scheint ICOS demnach in der Lage zu sein, durch die Expression von IL-21 ein autokrines Signal an den IL-21 Rezeptor zu senden, der die Populationsgröße von TFH Zellen steuert. Diese These würde auch erklären, dass die Applikation von anti-ICOS-L Antikörper zu späteren Zeitpunkten, wenn die Entwicklung der ersten TFH schon längst stattgefunden hat, die TFH-Population genauso beeinflusst, wie eine Blockade des ICOS Signals zu früheren Zeitpunkten. Da ICOS defiziente Mäuse immer noch in der

Lage sind, minimal IL-21 zu produzieren (King et al. 2008), bleibt es fraglich, ob ICOS für die Generierung der TFH Zellen eine Schlüsselrolle einnimmt. Die Daten der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass ICOS die Fähigkeit besitzt, die Langlebigkeit dieser Effektorsubpopulation zu verbessern, um eine ausreichende B-Zellhilfe zu gewährleisten.

4.4 Der Einfluss von ICOS auf Zytokine

In frühen Arbeiten wurde wiederholt beschrieben, dass die Stimulation mit anti-ICOS Antikörper oder ICOS-L Fusionsproteinen die Produktion von IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ , TNF- α und GM-CSF erhöht (Hutloff et al. 1999; McAdam et al. 2000). ICOS defiziente T-Zellen waren spezifisch in ihrer Fähigkeit IL-4 und IL-13 zu sezernieren beeinträchtigt (Dong et al. 2001a; McAdam et al. 2001; Tafuri et al. 2001). Die alleinige Anwesenheit von ICOS kann jedoch nicht unbedingt in Zusammenhang mit einer Rolle für die Differenzierung gebracht werden, denn Löhning zeigte erstmals, dass nicht die ICOS Expression generell, sondern die Stärke der Expression mit einem bestimmten Zytokinprofil korreliert. So produzieren ICOS^{intermediate} T-Zellen bevorzugt die proinflammatorischen Th2 Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, und die ICOS^{high} Expression korreliert sehr stark mit der Synthese des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 (Löhning et al. 2003). Da Regulatorische T-Zellen bekanntermaßen ebenfalls IL-10 produzieren, wäre es durchaus möglich gewesen, dass ICOS^{high} IL-10 Produzenten ausschließlich Regulatorische T-Zellen darstellen. Gezeigt wurde nun, dass die ICOS^{high} Expression in der Tat mit der Sekretion von IL-10 korreliert, jedoch Regulatorische und Effektor T-Zellen IL-10 in gleichem Maße sezernieren.

In der Literatur ist der Einfluss von ICOS auf die Expression von IFN- γ nicht klar definiert. In vielen Tiermodellen ruft das Fehlen des ICOS Signals eine erhöhte IFN- γ Expression hervor (Dong et al. 2001a; McAdam et al. 2001; Rutitzky et al. 2003; Watanabe et al. 2006). Im hier verwendeten adoptiven Transfermodell verhält es sich jedoch genau umgekehrt. Die fehlende ICOS Kostimulation führt nach Immunisierung und anschließender Restimulation zur Halbierung der IFN- γ -Produzenten nach einer Restimulation. Die IL-10 Produktion zeigte sich ebenfalls reduziert. Eine gleichzeitige Reduktion dieser beiden unterschiedlichen Zytokine konnte auch schon in verschiedenen Tiermodellen beobachtet werden. So beschrieb Sporici, dass die Anwesenheit von ICOS-Ig während der *in vitro* Aktivierung von MBP TZR transgenen T-Zellen die Übertragung von EAE auf den Rezipienten verhinderte. Die Unterbrechung der ICOS-ICOS-L Interaktion ging nachweislich mit einer reduzierten IFN- γ

und IL-10 Expression einher (Sporici et al. 2001). In einem Kollagen-induzierten Arthritismodell führte die Blockade von ICOS zur Abschwächung der Symptome. Die Untersuchung der *in vitro* restimulierten Zellen aus den drainierenden LN der Mäuse ergab ebenso beeinträchtigte IFN- γ und IL-10 Expressionen (Iwai et al. 2002). Und auch in einem Herz-Transplantationsmodell bewirkte die Behandlung mit anti-ICOS Antikörper eine Suppression dieser beiden Zytokine im Transplantat. Die verwendeten Messmethoden (ELISA u.ä.) erfassen jedoch stets die produzierten Zytokine aller Zellen. Die minimierte Zytokinexpression kann also auch auf eine Verringerung spezifischer Subpopulationen zurückzuführen sein, die IFN- γ und/oder IL-10 sezernieren. Auch bei den vorliegenden Daten kommt die verringerte IFN- γ Sekretion sehr wahrscheinlich allein durch die um die Hälfte reduzierten CD62L^{low} Effektorzellen innerhalb der Antigen-spezifischen T-Zellpopulation zustande (siehe Abb. 10). Es sind definitiv weitere Untersuchungen erforderlich, um auszuschließen, dass die IFN- γ einer einzelnen T-Zelle zusätzlich reduziert ist.

IL-2 wird von aktivierten T-Zellen produziert und induziert facettenreiche Effekte. Dieses Zytokin ist in der Lage, eine Reihe von Zielgenen auf transkriptioneller Ebene zu modulieren: Gene, die für den Zellzyklusverlauf von Bedeutung sind, Proto-Onkogene oder anti-apoptotische Gene wie Bcl-2 und Bcl-xL (Broome et al. 1995). Insbesondere für Regulatorische T-Zellen stellt IL-2 einen wichtigen Faktor für das Überleben und die Aktivierung suppressiver Eigenschaften dar (Thornton et al. 2004). Da die Regulatorischen T-Zellen in ICOS KO Mäusen stark vermindert waren, wurde die Expression von IL-2 detailliert in dieser Arbeit untersucht. Der in der Literatur beschriebene Defekt ICOS defizienter T-Zellen IL-2 zu sezernieren (Dong et al. 2001a; Nurieva et al. 2003b), konnte jedoch nicht bestätigt werden. Die Messungen der IL-2 Expression nach *in vitro* Restimulation und direkt *ex vivo*, durchgeführt nach Literaturangaben (Sojka et al. 2004), kamen alle zu der Aussage, dass ICOS keinen Einfluss auf die IL-2 Sekretion besitzt.

4.5 Dem Mechanismus auf der Spur

In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass die Interaktion von ICOS-L mit seinem Rezeptor das Überleben von Effektor und Regulatorischen T-Zellen positiv reguliert. Diese Entdeckung wirft unweigerlich Fragen auf: Welcher Mechanismus liegt dem zugrunde? Werden anti-apoptotische Signale direkt von ICOS angeschaltet und wenn ja, welche? Um Antworten auf diese offenen Fragen zu erhalten, wurde die Proteinexpression einiger

Moleküle untersucht, die für das Überleben oder die Eliminierung aktivierter T-Zellen bekanntermaßen eine Rolle spielen. Da ICOS auf keines dieser getesteten Moleküle einen Einfluss zu haben schien, erfolgte eine größer angelegte Analyse der RNA von Effektor T-Zellen, die jeweils ohne und mit ICOS Kostimulation *in vivo* aktiviert wurden. Auch diese Untersuchungen offenbarten jedoch kein Gen, welches durch das Fehlen von ICOS in seiner Expression stark verändert war. Gene, deren Expression leicht modifiziert war, wurden selbstverständlich sorgfältig analysiert. Insgesamt waren die Unterschiede jedoch so gering und inkonsistent, dass sich keine Schlüsse daraus ziehen ließen. Die gewählten Zeitpunkte 24, 48 und 72 h wurden bewusst ausgesucht, da die ICOS Expression 48 h nach Immunisierung ihr Maximum erreicht und dementsprechend auch der Einfluss von ICOS am stärksten ist. Die Zahl der Antigen-spezifischen T-Zellen war bereits 3 Tage nach der Immunisierung in der ICOS-L KO Gruppe reduziert. Veränderungen, die zu dieser Entwicklung führten, sollten theoretisch bereits vorher nachweisbar sein. Ein wichtiges Kriterium ist auch, dass die verwendeten Arrays nur eine Auswahl an Genen beinhalteten. Arrays, welche lückenlos das gesamte Mausgenom überprüfen, können natürlich mehr Informationen liefern. Die entsprechende Durchführung sollte in weiterführenden Arbeiten unbedingt berücksichtigt werden. Von entscheidender Relevanz kann aber auch der Phosphorylierungsgrad bestimmter Moleküle sein, für dessen Nachweis Arrayanalysen nicht geeignet sind.

Erst kürzlich erschien eine Publikation, die einen plausiblen Lösungsansatz für die hier aufgeworfene Fragestellung bietet. Wie bereits schon erwähnt, aktiviert der ICOS-ICOS-L Kontakt die PI3-Kinase. ICOS ist sogar in der Lage ein höheres Maß an PI3K-Aktivität zu induzieren als CD28 (Fos et al. 2008; Parry et al. 2003). Im PI3K/Akt-Signalweg führt die Aktivierung der PI3-Kinase unmittelbar zur Phosphorylierung der Protein Kinase B (auch Akt genannt) und diese wiederum zur Phosphorylierung des anti-apoptotischen Moleküls Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK-3). Fos und Arbeitskollegen gelang es anhand aktivierter humaner CD4⁺ T-Zellen nachzuweisen, dass die Bindung von ICOS-L an ICOS bereits nach 5 min eine stärkere Phosphorylierung von Akt hervorruft als die CD28-B7.1 Interaktion. Auch die GSK-3-Phosphorylierung wurde leicht erhöht. Die Blockade mittels anti-ICOS-L verhinderte die Phosphorylierung von Akt dagegen fast vollständig, die von GSK-3 nur partiell. Die Aktivierung von Akt wurde bereits in Verbindung mit der Langlebigkeit von T-Zellen gebracht. CD4⁺ T-Zellen, die in der Abwesenheit von OX-40 aktiviert wurden, zeichnen sich durch eine besonders kurze Lebensdauer aus (Song et al. 2004). In diesen T-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivität von Akt nicht über einen längeren

Zeitraum aufrecht erhalten werden kann. Auch OX-40 defiziente T-Zellen, die eine dominant-negative Variante von Akt exprimieren, sterben durch Apoptose. Dafür verantwortlich ist wie schon angesprochen eine geringere Expression anti-apoptotischer Proteine, welche normalerweise durch die aktive Kinase Akt „stimuliert“ werden. Die Involvierung im PI3K/Akt Signalweg, verleiht ICOS schlußfolgernd die Fähigkeit die Langlebigkeit von aktivierten T-Zellen positiv zu beeinflussen. Dieser kurz skizzierte Mechanismus könnte möglicherweise die Grundlage für die in dieser Arbeit beobachteten Effekte darstellen.

4.6 Der Stellenwert von ICOS für die CD8⁺ T-Zelle

CD8⁺ Effektor T-Zellen exprimieren weniger ICOS als CD4⁺ Effektor T-Zellen. Dennoch ist es erstaunlich, dass sich die CD8⁺ T-Zellen von ICOS KO Mäusen und die Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im ICOS-L KO Rezipienten derart unbeeinflusst zeigen. Lediglich die geringere homöostatische Expansion der Effektor-Memory CD8⁺ T-Zellen deutet darauf hin, dass ICOS für die CD8⁺ T-Zelle ebenfalls eine Rolle für das Überleben spielen könnte. Die Ergebnisse führen jedoch eher zu dem Schluß, dass ICOS für CD8⁺ T-Zellen eine ganz andere Funktion übernimmt. Sämtliche funktionelle Studien fokussierten bisher primär CD4⁺ T-Zellen. Über CD8⁺ T-Zellen in Verbindung mit ICOS existieren nur wenige Publikationen. Auch diese beschrieben gegensätzliche Effekte für die beiden T-Zellsubpopulationen: Die Abstoßungsreaktion in einem *Graft versus host disease*-Modell (GVHD), welche von CD4⁺ T-Zellen vermittelt wird, verringert sich in Folge der Unterbrechung der ICOS Kostimulation. Dagegen verstärkt das fehlende ICOS Signal die Entwicklung der von CD8⁺ T-Zellen vermittelten GVHD, die Überlebensrate sinkt (Yu et al. 2006). ICOS defiziente oder für ICOS blockierte CD8⁺ T-Zellen sollen in Anwesenheit eines Alloantigens viel stärker als die jeweiligen WT T-Zellen expandieren (Ogawa et al. 2001; Yu et al. 2006). Diese These wurde zusätzlich durch Versuche untermauert, in welchen T-Zellen mit anti-CD3, anti-CD3 plus anti-CD28 und anti-CD3 plus anti-ICOS *beads* stimuliert wurden. Während die CD28 Stimulation die Expansion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bewirkte, führte das Signal über ICOS ausschließlich zur Expansion von CD8⁺ T-Zellen (Watanabe et al. 2005). Nicht alle Publikationen kommen zu solchen Ergebnissen. Taylor beschrieb, dass die Blockade von ICOS sehr wohl auch die CD8⁺ T-Zell vermittelte GVHD verhindert (Taylor et al. 2005) und auch Wallin definierte die ICOS Kostimulation als positiven Regulator für die Expansion der CD8⁺ T-Zellen (Wallin et al. 2001). Weder aus den hier gezeigten Daten noch aus der Literatur ist es möglich eine allgemeingültige Funktion von

ICOS für CD8⁺ T-Zellen abzuleiten. Es bedarf daher in jedem Fall noch weiterer intensiver Studien um zu verstehen, wie und ob ICOS die Expansion, das Überleben und die Funktion der CD8⁺ T-Zelle steuert.

4.7 Die biologische Funktion von ICOS – Das Konzept

Die wichtigste biologische Rolle die ICOS erfüllt, ist den meisten Studien nach zu urteilen die positive Kostimulation von Effektor T-Zellen. Nicht alle durchgeführten Untersuchungen zur Rolle von ICOS *in vivo* stehen im Einklang mit diesem allgemeinen Funktionsmodell. Besonders Studien die die Toleranzmechanismen des Immunsystems näher untersuchen, lieferten konträre Ergebnisse. So führte die Blockade oder die Abwesenheit von ICOS während Allergen-induzierten Atemwegs- oder Schleimhautinflammationen zur Verstärkung der Symptome (Akbari et al. 2002; Gajewska et al. 2005; Miyamoto et al. 2005). Auch in einem murinen Diabetes-Modell, welches auf der sensiblen Balance von Regulatorischen und Effektor T-Zellen aufbaut, verursachte die Blockade von ICOS eine Reduktion von CD4⁺CD25⁺ Regulatorischen Zellen und damit einhergehend eine Verschlimmerung des Zustandes (Herman et al. 2004). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass ICOS sowohl die Population von Effektor und Memory T-Zellen als auch von Regulatorischen T-Zellen reguliert. Mit Hilfe dieses Resultates können die scheinbar so konträren Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungen sinnvoll erklärt werden. Zur Induktion der murinen Atemwegsinflammation wird in einigen Untersuchungen das Antigen zusammen mit Adjuvanz appliziert. Die Effektor T-Zellen, die dadurch initiiert werden, produzieren IL-4, IL-5 und IL-13 und sind für die Entstehung und die Aufrechterhaltung der Krankheit verantwortlich. Die beschriebenen experimentellen Bedingungen führen dazu, dass ICOS die Population der proinflammatorischen T-Zellen vergrößert und schlußfolgernd zum Ausmaß der Entzündungsreaktion beiträgt. Andere Modelle basieren auf der Applikation von Antigen ohne zusätzliches Adjuvanz um eine Atemwegsinflammation herbeizuführen, wodurch die Zahl an Regulatorischen T-Zellen im System erhöht wird (Akbari et al. 2002; Gajewska et al. 2005). Unter diesen Bedingungen kann man davon ausgehen, dass die Abwesenheit von ICOS zur Reduktion der Antigen-spezifischen Regulatorischen T-Zellen führt. Die Toleranz kann aufgrund der zu geringen Zellzahl an FoxP3⁺ T-Zellen nicht mehr aufrecht erhalten werden und eine Entzündungsreaktion folgt. Schon in früheren Studien zeichnete sich ab, dass ICOS nicht strikt mit einzelnen T-Zell-Differenzierungswegen verbunden ist. Zu diesem Thema existieren sehr konträre Studien: in einigen wird ICOS ausschließlich für die Th2-Dif-

ferenzierung verantwortlich gemacht wird (Coyle et al. 2000; Tafuri et al. 2001), andere führen ICOS nur im Zusammenhang mit Th1 Zellen auf (Hubbard et al. 2005; Villegas et al. 2002) und wiederum andere beschreiben die Bedeutung von ICOS für beide (Greenwald et al. 2002; McAdam et al. 2000; Smith et al. 2003; Wassink et al. 2004). In der Vergangenheit wurde vielmehr deutlich, dass nicht die Anwesenheit sondern die Intensität der ICOS Expression mit einem ganz charakteristischen Zytokinprofil verbunden ist (Löhning et al. 2003). Das hier beschriebene experimentelle System zeigt, dass ICOS auch für T-Zellen, die funktionell grundlegend verschieden sind, eine ähnliche Rolle spielen kann. Schlussfolgernd könnte ICOS für die Expansion und das Überleben aller T-Zellen, die ICOS auf hohem Niveau exprimieren, egal ob proinflammatorische Effektor T-Zellen, Regulatorische Effektor T-Zellen, Th1, Th2 oder Th17 T-Zellen von Bedeutung sein. In einem gegebenen Tiermodell würde die fehlende ICOS Kostimulation folglich immer den Phänotyp herbeiführen, der durch die Abwesenheit des dominierenden T-Zell Effektortyps hervorgerufen wird.

Literaturverzeichnis

- Abrams, J. S.; Roncarolo, M. G.; Yssel, H.; Andersson, U.; Gleich, G. J. und Silver, J. E. (1992): Strategies of anti-cytokine monoclonal antibody development: immunoassay of IL-10 and IL-5 in clinical samples, *Immunol.Rev.* (Band 127), Seite 5-24. URL: PM:1387110
- Agata, Y.; Kawasaki, A.; Nishimura, H.; Ishida, Y.; Tsubata, T.; Yagita, H. und Honjo, T. (1996): Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes, *Int.Immunol.* (Band 8), Nr. 5, Seite 765-772. URL: PM:8671665
- Akbari, O.; Freeman, G. J.; Meyer, E. H.; Greenfield, E. A.; Chang, T. T.; Sharpe, A. H.; Berry, G.; DeKruyff, R. H. und Umetsu, D. T. (2002): Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity, *Nat.Med.* (Band 8), Nr. 9, Seite 1024-1032. URL: PM:12145647
- Akiba, H.; Takeda, K.; Kojima, Y.; Usui, Y.; Harada, N.; Yamazaki, T.; Ma, J.; Tezuka, K.; Yagita, H. und Okumura, K. (2005): The role of ICOS in the CXCR5+ follicular B helper T cell maintenance in vivo, *J.Immunol.* (Band 175), Nr. 4, Seite 2340-2348. URL: PM:16081804
- Aliberti, J. (2005): Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*, *Nat.Rev.Immunol.* (Band 5), Nr. 2, Seite 162-170. URL: PM:15662369
- Allman, D.; Jain, A.; Dent, A.; Maile, R. R.; Selvaggi, T.; Kehry, M. R. und Staudt, L. M. (1996): BCL-6 expression during B-cell activation, *Blood* (Band 87), Nr. 12, Seite 5257-5268. URL: PM:8652841
- Allman, D. M.; Ferguson, S. E. und Cancro, M. P. (1992): Peripheral B cell maturation. I. Immature peripheral B cells in adults are heat-stable antigenhi and exhibit unique signaling characteristics, *J.Immunol.* (Band 149), Nr. 8, Seite 2533-2540. URL: PM:1383316
- Antia, R.; Pilyugin, S. S. und Ahmed, R. (1998): Models of immune memory: on the role of cross-reactive stimulation, competition, and homeostasis in maintaining immune memory, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 95), Nr. 25, Seite 14926-14931. URL: PM:9843992
- Aruffo, A. und Seed, B. (1987): Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 84), Nr. 23, Seite 8573-8577. URL: PM:2825196
- Azuma, M.; Ito, D.; Yagita, H.; Okumura, K.; Phillips, J. H.; Lanier, L. L. und Somoza, C. (1993): B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28, *Nature* (Band 366), Nr. 6450, Seite 76-79. URL: PM:7694153
- Bach, J. F.; Boitard, C.; Yasunami, R. und Dardenne, M. (1990): Control of diabetes in NOD mice by suppressor cells, *J.Autoimmun.* (Band 3 Suppl 1), Seite 97-100. URL: PM:2140263
- Bansal-Pakala, P.; Jember, A. G. und Croft, M. (2001): Signaling through OX40 (CD134) breaks peripheral T-cell tolerance, *Nat.Med.* (Band 7), Nr. 8, Seite 907-912. URL: PM:11479622
- Barnden, M. J.; Allison, J.; Heath, W. R. und Carbone, F. R. (1998): Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements, *Immunol.Cell Biol.* (Band 76), Nr. 1, Seite 34-40. URL: PM:9553774
- Beier, K. C.; Hutloff, A.; Dittrich, A. M.; Heuck, C.; Rauch, A.; Buchner, K.; Ludewig, B.; Ochs, H. D.; Mages, H. W. und Kroczeck, R. A. (2000): Induction, binding specificity and function of human ICOS, *Eur.J.Immunol.* (Band 30), Nr. 12, Seite 3707-3717. URL: PM:11169414
- Berard, M.; Brandt, K.; Bulfone-Paus, S. und Tough, D. F. (2003): IL-15 promotes the survival of naive and memory phenotype CD8+ T cells, *J.Immunol.* (Band 170), Nr. 10, Seite 5018-5026. URL: PM:12734346
- Betelli, E.; Carrier, Y.; Gao, W.; Korn, T.; Strom, T. B.; Oukka, M.; Weiner, H. L. und Kuchroo, V. K. (2006): Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells, *Nature* (Band 441), Nr. 7090, Seite 235-238. URL: PM:16648838
- Bodmer, J. L.; Schneider, P. und Tschopp, J. (2002): The molecular architecture of the TNF superfamily, *Trends Biochem.Sci.* (Band 27), Nr. 1, Seite 19-26. URL: PM:11796220

- Boise, L. H.; Minn, A. J.; Noel, P. J.; June, C. H.; Accavitti, M. A.; Lindsten, T. und Thompson, C. B. (1995): CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL, *Immunity*. (Band 3), Nr. 1, Seite 87-98. URL: PM:7621080
- Boldin, M. P.; Varfolomeev, E. E.; Pancer, Z.; Mett, I. L.; Camonis, J. H. und Wallach, D. (1995): A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain, *J.Biol.Chem.* (Band 270), Nr. 14, Seite 7795-7798. URL: PM:7536190
- Bonhagen, K.; Liesenfeld, O.; Staderker, M. J.; Hutloff, A.; Erb, K.; Coyle, A. J.; Lipp, M.; Kroczeck, R. A. und Kamradt, T. (2003): ICOS⁺ Th cells produce distinct cytokines in different mucosal immune responses, *Eur.J.Immunol.* (Band 33), Nr. 2, Seite 392-401. URL: PM:12645936
- Borriello, F.; Sethna, M. P.; Boyd, S. D.; Schweitzer, A. N.; Tivol, E. A.; Jacoby, D.; Strom, T. B.; Simpson, E. M.; Freeman, G. J. und Sharpe, A. H. (1997): B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation, *Immunity*. (Band 6), Nr. 3, Seite 303-313. URL: PM:9075931
- Borsellino, G.; Kleinewietfeld, M.; Di Mitri, D.; Sternjak, A.; Diamantini, A.; Giometto, R.; Hopner, S.; Centonze, D.; Bernardi, G.; Dell'Acqua, M. L.; Rossini, P. M.; Battistini, L.; Rotzschke, O. und Falk, K. (2007): Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression, *Blood* (Band 110), Nr. 4, Seite 1225-1232. URL: PM:17449799
- Bossaller, L.; Burger, J.; Draeger, R.; Grimbacher, B.; Knoth, R.; Plebani, A.; Durandy, A.; Baumann, U.; Schlesier, M.; Welcher, A. A.; Peter, H. H. und Warnatz, K. (2006): ICOS deficiency is associated with a severe reduction of CXCR5⁺CD4⁺ germinal center Th cells, *J.Immunol.* (Band 177), Nr. 7, Seite 4927-4932. URL: PM:16982935
- Bretscher, P. und Cohn, M. (1970): A theory of self-nonsel self discrimination, *Science* (Band 169), Nr. 950, Seite 1042-1049. URL: PM:4194660
- Bretscher, P. A. (1999): A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 96), Nr. 1, Seite 185-190. URL: PM:9874793
- Brodie, D.; Collins, A. V.; Iaboni, A.; Fennelly, J. A.; Sparks, L. M.; Xu, X. N.; van der Merwe, P. A. und Davis, S. J. (2000): LICOS, a primordial costimulatory ligand?, *Curr.Biol.* (Band 10), Nr. 6, Seite 333-336. URL: PM:10744980
- Broome, H. E.; Dargan, C. M.; Krajewski, S. und Reed, J. C. (1995): Expression of Bcl-2, Bcl-x, and Bax after T cell activation and IL-2 withdrawal, *J.Immunol.* (Band 155), Nr. 5, Seite 2311-2317. URL: PM:7650367
- Brunet, J. F.; Denizot, F.; Luciani, M. F.; Roux-Dosseto, M.; Suzan, M.; Mattei, M. G. und Golstein, P. (1987): A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4, *Nature* (Band 328), Nr. 6127, Seite 267-270. URL: PM:3496540
- Brunkow, M. E.; Jeffery, E. W.; Hjerrild, K. A.; Paepers, B.; Clark, L. B.; Yasayko, S. A.; Wilkinson, J. E.; Galas, D.; Ziegler, S. F. und Ramsdell, F. (2001): Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse, *Nat.Genet.* (Band 27), Nr. 1, Seite 68-73. URL: PM:11138001
- Brunner, M. C.; Chambers, C. A.; Chan, F. K.; Hanke, J.; Winoto, A. und Allison, J. P. (1999): CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation, *J.Immunol.* (Band 162), Nr. 10, Seite 5813-5820. URL: PM:10229815
- Burmeister, Y.; Lischke, T.; Dahler, A. C.; Mages, H. W.; Lam, K. P.; Coyle, A. J.; Kroczeck, R. A. und Hutloff, A. (2008): ICOS controls the pool size of effector-memory and regulatory T cells, *J.Immunol.* (Band 180), Nr. 2, Seite 774-782. URL: PM:18178815
- Burr, J. S.; Savage, N. D.; Messah, G. E.; Kimzey, S. L.; Shaw, A. S.; Arch, R. H. und Green, J. M. (2001): Cutting edge: distinct motifs within CD28 regulate T cell proliferation and induction of Bcl-XL, *J.Immunol.* (Band 166), Nr. 9, Seite 5331-5335. URL: PM:11313368
- Campbell, J. J. und Butcher, E. C. (2000): Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing, *Curr.Opin.Immunol.* (Band 12), Nr. 3, Seite 336-341. URL: PM:10781407

- Cao, X.; Cai, S. F.; Fehniger, T. A.; Song, J.; Collins, L. I.; Piwnica-Worms, D. R. und Ley, T. J. (2007): Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance, *Immunity*. (Band 27), Nr. 4, Seite 635-646. URL: PM:17919943
- Chapoval, A. I.; Ni, J.; Lau, J. S.; Wilcox, R. A.; Flies, D. B.; Liu, D.; Dong, H.; Sica, G. L.; Zhu, G.; Tamada, K. und Chen, L. (2001): B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production, *Nat.Immunol.* (Band 2), Nr. 3, Seite 269-274. URL: PM:11224528
- Chtanova, T.; Tangye, S. G.; Newton, R.; Frank, N.; Hodge, M. R.; Rolph, M. S. und Mackay, C. R. (2004): T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells, *J.Immunol.* (Band 173), Nr. 1, Seite 68-78. URL: PM:15210760
- Cliffe, L. J. und Grencis, R. K. (2004): The *Trichuris muris* system: a paradigm of resistance and susceptibility to intestinal nematode infection, *Adv.Parasitol.* (Band 57), Seite 255-307. URL: PM:15504540
- Collison, L. W.; Workman, C. J.; Kuo, T. T.; Boyd, K.; Wang, Y.; Vignali, K. M.; Cross, R.; Sehy, D.; Blumberg, R. S. und Vignali, D. A. (2007): The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function, *Nature* (Band 450), Nr. 7169, Seite 566-569. URL: PM:18033300
- Coquet, J. M.; Kyriakoudis, K.; Pellicci, D. G.; Besra, G.; Berzins, S. P.; Smyth, M. J. und Godfrey, D. I. (2007): IL-21 is produced by NKT cells and modulates NKT cell activation and cytokine production, *J.Immunol.* (Band 178), Nr. 5, Seite 2827-2834. URL: PM:17312126
- Coyle, A. J.; Lehar, S.; Lloyd, C.; Tian, J.; Delaney, T.; Manning, S.; Nguyen, T.; Burwell, T.; Schneider, H.; Gonzalo, J. A.; Gosselin, M.; Owen, L. R.; Rudd, C. E. und Gutierrez-Ramos, J. C. (2000): The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses, *Immunity*. (Band 13), Nr. 1, Seite 95-105. URL: PM:10933398
- Cyster, J. G.; Ansel, K. M.; Reif, K.; Ekland, E. H.; Hyman, P. L.; Tang, H. L.; Luther, S. A. und Ngo, V. N. (2000): Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles, *Immunol.Rev.* (Band 176), Seite 181-193. URL: PM:11043777
- Deaglio, S.; Dwyer, K. M.; Gao, W.; Friedman, D.; Usheva, A.; Erat, A.; Chen, J. F.; Enjyoji, K.; Linden, J.; Oukka, M.; Kuchroo, V. K.; Strom, T. B. und Robson, S. C. (2007): Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression, *J.Exp.Med.* (Band 204), Nr. 6, Seite 1257-1265. URL: PM:17502665
- Dong, C. (2008): TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming, *Nat.Rev.Immunol.* (Band 8), Nr. 5, Seite 337-348. URL: PM:18408735
- Dong, C.; Juedes, A. E.; Temann, U. A.; Shresta, S.; Allison, J. P.; Ruddle, N. H. und Flavell, R. A. (2001a): ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function, *Nature* (Band 409), Nr. 6816, Seite 97-101. URL: PM:11343121
- Dong, C. und Nurieva, R. I. (2003): Regulation of immune and autoimmune responses by ICOS, *J.Autoimmun.* (Band 21), Nr. 3, Seite 255-260. URL: PM:14599850
- Dong, C.; Temann, U. A. und Flavell, R. A. (2001b): Cutting edge: critical role of inducible costimulator in germinal center reactions, *J.Immunol.* (Band 166), Nr. 6, Seite 3659-3662. URL: PM:11238604
- Dong, H.; Zhu, G.; Tamada, K. und Chen, L. (1999): B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion, *Nat.Med.* (Band 5), Nr. 12, Seite 1365-1369. URL: PM:10581077
- Dong, H.; Zhu, G.; Tamada, K.; Flies, D. B.; van Deursen, J. M. und Chen, L. (2004): B7-H1 determines accumulation and deletion of intrahepatic CD8(+) T lymphocytes, *Immunity*. (Band 20), Nr. 3, Seite 327-336. URL: PM:15030776
- Dummer, W.; Ernst, B.; LeRoy, E.; Lee, D. und Surh, C. (2001): Autologous regulation of naive T cell homeostasis within the T cell compartment, *J.Immunol.* (Band 166), Nr. 4, Seite 2460-2468. URL: PM:11160306

- Dutton, R. W.; Bradley, L. M. und Swain, S. L. (1998): T cell memory, *Annu.Rev.Immunol.* (Band 16), Seite 201-223. URL: PM:9597129
- Fallarino, F.; Grohmann, U.; Hwang, K. W.; Orabona, C.; Vacca, C.; Bianchi, R.; Belladonna, M. L.; Fioretti, M. C.; Alegre, M. L. und Puccetti, P. (2003): Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells, *Nat.Immunol.* (Band 4), Nr. 12, Seite 1206-1212. URL: PM:14578884
- Fontenot, J. D.; Gavin, M. A. und Rudensky, A. Y. (2003): Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells, *Nat.Immunol.* (Band 4), Nr. 4, Seite 330-336. URL: PM:12612578
- Fos, C.; Salles, A.; Lang, V.; Carrette, F.; Audebert, S.; Pastor, S.; Ghiotto, M.; Olive, D.; Bismuth, G. und Nunes, J. A. (2008): ICOS ligation recruits the p50alpha PI3K regulatory subunit to the immunological synapse, *J.Immunol.* (Band 181), Nr. 3, Seite 1969-1977. URL: PM:18641334
- Freeman, G. J.; Gray, G. S.; Gimmi, C. D.; Lombard, D. B.; Zhou, L. J.; White, M.; Fingerhuth, J. D.; Gribben, J. G. und Nadler, L. M. (1991): Structure, expression, and T cell costimulatory activity of the murine homologue of the human B lymphocyte activation antigen B7, *J.Exp.Med.* (Band 174), Nr. 3, Seite 625-631. URL: PM:1714935
- Freeman, G. J.; Gribben, J. G.; Boussiotis, V. A.; Ng, J. W.; Restivo, V. A., Jr.; Lombard, L. A.; Gray, G. S. und Nadler, L. M. (1993): Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation, *Science* (Band 262), Nr. 5135, Seite 909-911. URL: PM:7694363
- Freeman, G. J.; Long, A. J.; Iwai, Y.; Bourque, K.; Chernova, T.; Nishimura, H.; Fitz, L. J.; Malenkovich, N.; Okazaki, T.; Byrne, M. C.; Horton, H. F.; Fouser, L.; Carter, L.; Ling, V.; Bowman, M. R.; Carreno, B. M.; Collins, M.; Wood, C. R. und Honjo, T. (2000): Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation, *J.Exp.Med.* (Band 192), Nr. 7, Seite 1027-1034. URL: PM:11015443
- Gajewska, B. U.; Tafuri, A.; Swirski, F. K.; Walker, T.; Johnson, J. R.; Shea, T.; Shahinian, A.; Goncharova, S.; Mak, T. W.; Stampfli, M. R. und Jordana, M. (2005): B7RP-1 is not required for the generation of Th2 responses in a model of allergic airway inflammation but is essential for the induction of inhalation tolerance, *J.Immunol.* (Band 174), Nr. 5, Seite 3000-3005. URL: PM:15728513
- Garcon, F.; Patton, D. T.; Emery, J. L.; Hirsch, E.; Rottapel, R.; Sasaki, T. und Okkenhaug, K. (2008): CD28 provides T-cell costimulation and enhances PI3K activity at the immune synapse independently of its capacity to interact with the p85/p110 heterodimer, *Blood* (Band 111), Nr. 3, Seite 1464-1471. URL: PM:18006698
- Garside, P.; Ingulli, E.; Merica, R. R.; Johnson, J. G.; Noelle, R. J. und Jenkins, M. K. (1998): Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node, *Science* (Band 281), Nr. 5373, Seite 96-99. URL: PM:9651253
- Gershon, R. K. und Kondo, K. (1970): Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes, *Immunology* (Band 18), Nr. 5, Seite 723-737. URL: PM:4911896
- Gondek, D. C.; Lu, L. F.; Quezada, S. A.; Sakaguchi, S. und Noelle, R. J. (2005): Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism, *J.Immunol.* (Band 174), Nr. 4, Seite 1783-1786. URL: PM:15699103
- Gonzalo, J. A.; Tian, J.; Delaney, T.; Corcoran, J.; Rottman, J. B.; Lora, J.; Al garawi, A.; Kroczeck, R.; Gutierrez-Ramos, J. C. und Coyle, A. J. (2001): ICOS is critical for T helper cell-mediated lung mucosal inflammatory responses, *Nat.Immunol.* (Band 2), Nr. 7, Seite 597-604. URL: PM:11429543
- Grayson, J. M.; Zajac, A. J.; Altman, J. D. und Ahmed, R. (2000): Cutting edge: increased expression of Bcl-2 in antigen-specific memory CD8+ T cells, *J.Immunol.* (Band 164), Nr. 8, Seite 3950-3954. URL: PM:10754284
- Greenwald, R. J.; Boussiotis, V. A.; Lorschach, R. B.; Abbas, A. K. und Sharpe, A. H. (2001): CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo, *Immunity*. (Band 14), Nr. 2, Seite 145-155. URL: PM:11239447
- Greenwald, R. J.; Freeman, G. J. und Sharpe, A. H. (2005): The B7 family revisited, *Annu.Rev.Immunol.* (Band 23), Seite 515-548. URL: PM:15771580

- Greenwald, R. J.; McAdam, A. J.; Van der, Woude D.; Satoskar, A. R. und Sharpe, A. H. (2002): Cutting edge: inducible costimulator protein regulates both Th1 and Th2 responses to cutaneous leishmaniasis, *J.Immunol.* (Band 168), Nr. 3, Seite 991-995. URL: PM:11801630
- Grencis, R. K. (1993): Cytokine-mediated regulation of intestinal helminth infections: the *Trichuris muris* model, *Ann.Trop.Med.Parasitol.* (Band 87), Nr. 6, Seite 643-647. URL: PM:8122927
- Grimbacher, B.; Hutloff, A.; Schlesier, M.; Glocker, E.; Warnatz, K.; Dräger, R.; Eibel, H.; Fischer, B.; Schaffer, A. A.; Mages, H. W.; Kroczeck, R. A. und Peter, H. H. (2003): Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency, *Nat.Immunol.* (Band 4), Nr. 3, Seite 261-268. URL: PM:12577056
- Gross, J. A.; Callas, E. und Allison, J. P. (1992): Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse, *J.Immunol.* (Band 149), Nr. 2, Seite 380-388. URL: PM:1320641
- Gudmundsdottir, H. und Turka, L. A. (2001): A closer look at homeostatic proliferation of CD4+ T cells: costimulatory requirements and role in memory formation, *J.Immunol.* (Band 167), Nr. 7, Seite 3699-3707. URL: PM:11564785
- Gunn, M. D.; Ngo, V. N.; Ansel, K. M.; Ekland, E. H.; Cyster, J. G. und Williams, L. T. (1998): A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1, *Nature* (Band 391), Nr. 6669, Seite 799-803. URL: PM:9486651
- Hathcock, K. S.; Kaech, S. M.; Ahmed, R. und Hodes, R. J. (2003): Induction of telomerase activity and maintenance of telomere length in virus-specific effector and memory CD8+ T cells, *J.Immunol.* (Band 170), Nr. 1, Seite 147-152. URL: PM:12496394
- Hathcock, K. S.; Laszlo, G.; Pucillo, C.; Linsley, P. und Hodes, R. J. (1994): Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function, *J.Exp.Med.* (Band 180), Nr. 2, Seite 631-640. URL: PM:7519245
- Hawrylowicz, C. M. und O'Garra, A. (2005): Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma, *Nat.Rev.Immunol.* (Band 5), Nr. 4, Seite 271-283. URL: PM:15775993
- Haynes, N. M.; Allen, C. D.; Lesley, R.; Ansel, K. M.; Killeen, N. und Cyster, J. G. (2007): Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation, *J.Immunol.* (Band 179), Nr. 8, Seite 5099-5108. URL: PM:17911595
- Herman, A. E.; Freeman, G. J.; Mathis, D. und Benoist, C. (2004): CD4+CD25+ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion, *J.Exp.Med.* (Band 199), Nr. 11, Seite 1479-1489. URL: PM:15184501
- Hestdal, K.; Ruscetti, F. W.; Ihle, J. N.; Jacobsen, S. E.; Dubois, C. M.; Kopp, W. C.; Longo, D. L. und Keller, J. R. (1991): Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells, *J.Immunol.* (Band 147), Nr. 1, Seite 22-28. URL: PM:1711076
- Hildeman, D. A.; Zhu, Y.; Mitchell, T. C.; Bouillet, P.; Strasser, A.; Kappler, J. und Marrack, P. (2002a): Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim, *Immunity.* (Band 16), Nr. 6, Seite 759-767. URL: PM:12121658
- Hildeman, D. A.; Zhu, Y.; Mitchell, T. C.; Kappler, J. und Marrack, P. (2002b): Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo, *Curr.Opin.Immunol.* (Band 14), Nr. 3, Seite 354-359. URL: PM:11973134
- Hogquist, K. A.; Jameson, S. C.; Heath, W. R.; Howard, J. L.; Bevan, M. J. und Carbone, F. R. (1994): T cell receptor antagonist peptides induce positive selection, *Cell* (Band 76), Nr. 1, Seite 17-27. URL: PM:8287475
- Hori, S.; Nomura, T. und Sakaguchi, S. (2003): Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3, *Science* (Band 299), Nr. 5609, Seite 1057-1061. URL: PM:12522256
- Hsieh, C. S.; Liang, Y.; Tyznik, A. J.; Self, S. G.; Liggitt, D. und Rudensky, A. Y. (2004): Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors, *Immunity.* (Band 21), Nr. 2, Seite 267-277. URL: PM:15308106

- Hubbard, V. M.; Eng, J. M.; Ramirez-Montagut, T.; Tjoe, K. H.; Muriglan, S. J.; Kochman, A. A.; Terwey, T. H.; Willis, L. M.; Schiro, R.; Heller, G.; Murphy, G. F.; Liu, C.; Alpdogan, O. und van den Brink, M. R. (2005): Absence of inducible costimulator on alloreactive T cells reduces graft versus host disease and induces Th2 deviation, *Blood* (Band 106), Nr. 9, Seite 3285-3292. URL: PM:15956289
- Hutloff, A.; Dittrich, A. M.; Beier, K. C.; Eljaschewitsch, B.; Kraft, R.; Anagnostopoulos, I. und Kroczeck, R. A. (1999): ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28, *Nature* (Band 397), Nr. 6716, Seite 263-266. URL: PM:9930702
- Iwai, H.; Kozono, Y.; Hirose, S.; Akiba, H.; Yagita, H.; Okumura, K.; Kohsaka, H.; Miyasaka, N. und Azuma, M. (2002): Amelioration of collagen-induced arthritis by blockade of inducible costimulator-B7 homologous protein costimulation, *J.Immunol.* (Band 169), Nr. 8, Seite 4332-4339. URL: PM:12370365
- Kim, H. P.; Korn, L. L.; Gamero, A. M. und Leonard, W. J. (2005): Calcium-dependent activation of interleukin-21 gene expression in T cells, *J.Biol.Chem.* (Band 280), Nr. 26, Seite 25291-25297. URL: PM:15879595
- King, C.; Tangye, S. G. und Mackay, C. R. (2008): T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses, *Annu.Rev.Immunol.* (Band 26), Seite 741-766. URL: PM:18173374
- Kobie, J. J.; Shah, P. R.; Yang, L.; Rebhahn, J. A.; Fowell, D. J. und Mosmann, T. R. (2006): T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine, *J.Immunol.* (Band 177), Nr. 10, Seite 6780-6786. URL: PM:17082591
- Kondrack, R. M.; Harbertson, J.; Tan, J. T.; McBreen, M. E.; Surh, C. D. und Bradley, L. M. (2003): Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells, *J.Exp.Med.* (Band 198), Nr. 12, Seite 1797-1806. URL: PM:14662907
- Kopf, M.; Coyle, A. J.; Schmitz, N.; Barner, M.; Oxenius, A.; Gallimore, A.; Gutierrez-Ramos, J. C. und Bachmann, M. F. (2000): Inducible costimulator protein (ICOS) controls T helper cell subset polarization after virus and parasite infection, *J.Exp.Med.* (Band 192), Nr. 1, Seite 53-61. URL: PM:10880526
- Krummel, M. F. und Allison, J. P. (1995): CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation, *J.Exp.Med.* (Band 182), Nr. 2, Seite 459-465. URL: PM:7543139
- Kwon, B. S.; Hurtado, J. C.; Lee, Z. H.; Kwack, K. B.; Seo, S. K.; Choi, B. K.; Koller, B. H.; Wolisi, G.; Broxmeyer, H. E. und Vinay, D. S. (2002): Immune responses in 4-1BB (CD137)-deficient mice, *J.Immunol.* (Band 168), Nr. 11, Seite 5483-5490. URL: PM:12023342
- Latchman, Y.; Wood, C. R.; Chernova, T.; Chaudhary, D.; Borde, M.; Chernova, I.; Iwai, Y.; Long, A. J.; Brown, J. A.; Nunes, R.; Greenfield, E. A.; Bourque, K.; Boussiotis, V. A.; Carter, L. L.; Carreno, B. M.; Malenkovich, N.; Nishimura, H.; Okazaki, T.; Honjo, T.; Sharpe, A. H. und Freeman, G. J. (2001): PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation, *Nat.Immunol.* (Band 2), Nr. 3, Seite 261-268. URL: PM:11224527
- Ledbetter, J. A.; Imboden, J. B.; Schieven, G. L.; Grosmaire, L. S.; Rabinovitch, P. S.; Lindsten, T.; Thompson, C. B. und June, C. H. (1990): CD28 ligation in T-cell activation: evidence for two signal transduction pathways, *Blood* (Band 75), Nr. 7, Seite 1531-1539. URL: PM:2156582
- Leonard, W. J. und Spolski, R. (2005): Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation, *Nat.Rev.Immunol.* (Band 5), Nr. 9, Seite 688-698. URL: PM:16138102
- Li, M. O.; Wan, Y. Y. und Flavell, R. A. (2007): T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation, *Immunity.* (Band 26), Nr. 5, Seite 579-591. URL: PM:17481928
- Ling, V.; Wu, P. W.; Finnerty, H. F.; Bean, K. M.; Spaulding, V.; Fouser, L. A.; Leonard, J. P.; Hunter, S. E.; Zollner, R.; Thomas, J. L.; Miyashiro, J. S.; Jacobs, K. A. und Collins, M. (2000): Cutting edge: identification of GL50, a novel B7-like protein that functionally binds to ICOS receptor, *J.Immunol.* (Band 164), Nr. 4, Seite 1653-1657. URL: PM:10657606

- Linsley, P. S.; Bradshaw, J.; Greene, J.; Peach, R.; Bennett, K. L. und Mittler, R. S. (1996): Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement, *Immunity*. (Band 4), Nr. 6, Seite 535-543. URL: PM:8673700
- Liu, Y. J.; Malisan, F.; de Bouteiller, O.; Guret, C.; Lebecque, S.; Banchereau, J.; Mills, F. C.; Max, E. E. und Martinez-Valdez, H. (1996): Within germinal centers, isotype switching of immunoglobulin genes occurs after the onset of somatic mutation, *Immunity*. (Band 4), Nr. 3, Seite 241-250. URL: PM:8624814
- Löhning, M.; Hutloff, A.; Kallinich, T.; Mages, H. W.; Bonhagen, K.; Radbruch, A.; Hamelmann, E. und Kroczeck, R. A. (2003): Expression of ICOS in vivo defines CD4⁺ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10, *J.Exp.Med.* (Band 197), Nr. 2, Seite 181-193. URL: PM:12538658
- Loke, P.; Zang, X.; Hsuan, L.; Waitz, R.; Locksley, R. M.; Allen, J. E. und Allison, J. P. (2005): Inducible costimulator is required for type 2 antibody isotype switching but not T helper cell type 2 responses in chronic nematode infection, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 102), Nr. 28, Seite 9872-9877. URL: PM:15994233
- Mages, H. W.; Hutloff, A.; Heuck, C.; Büchner, K.; Himmelbauer, H.; Oliveri, F. und Kroczeck, R. A. (2000): Molecular cloning and characterization of murine ICOS and identification of B7h as ICOS ligand, *Eur.J.Immunol.* (Band 30), Nr. 4, Seite 1040-1047. URL: PM:10760791
- Mak, T. W.; Shahinian, A.; Yoshinaga, S. K.; Wakeham, A.; Boucher, L. M.; Pintilie, M.; Duncan, G.; Gajewska, B. U.; Gronski, M.; Eriksson, U.; Odermatt, B.; Ho, A.; Bouchard, D.; Whorisky, J. S.; Jordana, M.; Ohashi, P. S.; Pawson, T.; Bladt, F. und Tafuri, A. (2003): Costimulation through the inducible costimulator ligand is essential for both T helper and B cell functions in T cell-dependent B cell responses, *Nat.Immunol.* (Band 4), Nr. 8, Seite 765-772. URL: PM:12833154
- Maloy, K. J.; Salaun, L.; Cahill, R.; Dougan, G.; Saunders, N. J. und Powrie, F. (2003): CD4⁺CD25⁺ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms, *J.Exp.Med.* (Band 197), Nr. 1, Seite 111-119. URL: PM:12515818
- McAdam, A. J.; Chang, T. T.; Lumelsky, A. E.; Greenfield, E. A.; Boussiotis, V. A.; Duke-Cohan, J. S.; Chernova, T.; Malenkovich, N.; Jabs, C.; Kuchroo, V. K.; Ling, V.; Collins, M.; Sharpe, A. H. und Freeman, G. J. (2000): Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4⁺ T cells, *J.Immunol.* (Band 165), Nr. 9, Seite 5035-5040. URL: PM:11046032
- McAdam, A. J.; Greenwald, R. J.; Levin, M. A.; Chernova, T.; Malenkovich, N.; Ling, V.; Freeman, G. J. und Sharpe, A. H. (2001): ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching, *Nature* (Band 409), Nr. 6816, Seite 102-105. URL: PM:11343122
- McHeyzer-Williams, M. G. und Davis, M. M. (1995): Antigen-specific development of primary and memory T cells in vivo, *Science* (Band 268), Nr. 5207, Seite 106-111. URL: PM:7535476
- Mescher, M. F.; Curtsinger, J. M.; Agarwal, P.; Casey, K. A.; Gerner, M.; Hammerbeck, C. D.; Popescu, F. und Xiao, Z. (2006): Signals required for programming effector and memory development by CD8⁺ T cells, *Immunol.Rev.* (Band 211), Seite 81-92. URL: PM:16824119
- Min, B.; Yamane, H.; Hu-Li, J. und Paul, W. E. (2005): Spontaneous and homeostatic proliferation of CD4 T cells are regulated by different mechanisms, *J.Immunol.* (Band 174), Nr. 10, Seite 6039-6044. URL: PM:15879097
- Misra, N.; Bayry, J.; Lacroix-Desmazes, S.; Kazatchkine, M. D. und Kaveri, S. V. (2004): Cutting edge: human CD4⁺CD25⁺ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells, *J.Immunol.* (Band 172), Nr. 8, Seite 4676-4680. URL: PM:15067041
- Miyamoto, K.; Kingsley, C. I.; Zhang, X.; Jabs, C.; Izikson, L.; Sobel, R. A.; Weiner, H. L.; Kuchroo, V. K. und Sharpe, A. H. (2005): The ICOS molecule plays a crucial role in the development of mucosal tolerance, *J.Immunol.* (Band 175), Nr. 11, Seite 7341-7347. URL: PM:16301640
- Moser, B. und Ebert, L. (2003): Lymphocyte traffic control by chemokines: follicular B helper T cells, *Immunol.Lett.* (Band 85), Nr. 2, Seite 105-112. URL: PM:12527215

- Nishimura, H.; Nose, M.; Hiai, H.; Minato, N. und Honjo, T. (1999): Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor, *Immunity*. (Band 11), Nr. 2, Seite 141-151. URL: PM:10485649
- Nurieva, R. I.; Chung, Y.; Hwang, D.; Yang, X. O.; Kang, H. S.; Ma, L.; Wang, Y. H.; Watowich, S. S.; Jetten, A. M.; Tian, Q. und Dong, C. (2008): Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages, *Immunity*. (Band 29), Nr. 1, Seite 138-149. URL: PM:18599325
- Nurieva, R. I.; Chuvpilo, S.; Wieder, E. D.; Elkon, K. B.; Locksley, R.; Serfling, E. und Dong, C. (2007): A costimulation-initiated signaling pathway regulates NFATc1 transcription in T lymphocytes, *J.Immunol.* (Band 179), Nr. 2, Seite 1096-1103. URL: PM:17617602
- Nurieva, R. I.; Duong, J.; Kishikawa, H.; Dianzani, U.; Rojo, J. M.; Ho, I.; Flavell, R. A. und Dong, C. (2003a): Transcriptional regulation of th2 differentiation by inducible costimulator, *Immunity*. (Band 18), Nr. 6, Seite 801-811. URL: PM:12818161
- Nurieva, R. I.; Mai, X. M.; Forbush, K.; Bevan, M. J. und Dong, C. (2003b): B7h is required for T cell activation, differentiation, and effector function, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 100), Nr. 24, Seite 14163-14168. URL: PM:14615582
- Oberle, N.; Eberhardt, N.; Falk, C. S.; Krammer, P. H. und Suri-Payer, E. (2007): Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4+CD25 T cells by CD4+Foxp3+ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF-beta, and various inhibitors of TCR signaling, *J.Immunol.* (Band 179), Nr. 6, Seite 3578-3587. URL: PM:17785792
- Oderup, C.; Cederbom, L.; Makowska, A.; Cilio, C. M. und Ivars, F. (2006): Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression, *Immunology* (Band 118), Nr. 2, Seite 240-249. URL: PM:16771859
- Ogawa, S.; Nagamatsu, G.; Watanabe, M.; Watanabe, S.; Hayashi, T.; Horita, S.; Nitta, K.; Nihei, H.; Tezuka, K. und Abe, R. (2001): Opposing effects of anti-activation-inducible lymphocyte-immunomodulatory molecule/inducible costimulator antibody on the development of acute versus chronic graft-versus-host disease, *J.Immunol.* (Band 167), Nr. 10, Seite 5741-5748. URL: PM:11698447
- Ohnishi, H.; Ledbetter, J. A.; Kanner, S. B.; Linsley, P. S.; Tanaka, T.; Geller, A. M. und Kotb, M. (1995): CD28 cross-linking augments TCR-mediated signals and costimulates superantigen responses, *J.Immunol.* (Band 154), Nr. 7, Seite 3180-3193. URL: PM:7534790
- Ortega, G.; Robb, R. J.; Shevach, E. M. und Malek, T. R. (1984): The murine IL 2 receptor. I. Monoclonal antibodies that define distinct functional epitopes on activated T cells and react with activated B cells, *J.Immunol.* (Band 133), Nr. 4, Seite 1970-1975. URL: PM:6206144
- Özkaynak, E.; Gao, W.; Shemmeri, N.; Wang, C.; Gutierrez-Ramos, J. C.; Amaral, J.; Qin, S.; Rottman, J. B.; Coyle, A. J. und Hancock, W. W. (2001): Importance of ICOS-B7RP-1 costimulation in acute and chronic allograft rejection, *Nat.Immunol.* (Band 2), Nr. 7, Seite 591-596. URL: PM:11429542
- Parry, R. V.; Rumbley, C. A.; Vandenberghe, L. H.; June, C. H. und Riley, J. L. (2003): CD28 and inducible costimulatory protein Src homology 2 binding domains show distinct regulation of phosphatidylinositol 3-kinase, Bcl-xL, and IL-2 expression in primary human CD4 T lymphocytes, *J.Immunol.* (Band 171), Nr. 1, Seite 166-174. URL: PM:12816995
- Pearce, E. L. und Shen, H. (2007): Generation of CD8 T cell memory is regulated by IL-12, *J.Immunol.* (Band 179), Nr. 4, Seite 2074-2081. URL: PM:17675465
- Peschon, J. J.; Morrissey, P. J.; Grabstein, K. H.; Ramsdell, F. J.; Maraskovsky, E.; Gliniak, B. C.; Park, L. S.; Ziegler, S. F.; Williams, D. E.; Ware, C. B.; Meyer, J. D. und Davison, B. L. (1994): Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice, *J.Exp.Med.* (Band 180), Nr. 5, Seite 1955-1960. URL: PM:7964471
- Prat, M.; Gribaudo, G.; Comoglio, P. M.; Cavallo, G. und Landolfo, S. (1984): Monoclonal antibodies against murine gamma interferon, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 81), Nr. 14, Seite 4515-4519. URL: PM:6431408

- Quezada, S. A.; Jarvinen, L. Z.; Lind, E. F. und Noelle, R. J. (2004): CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity, *Annu.Rev.Immunol.* (Band 22), Seite 307-328. URL: PM:15032580
- Raab, M.; Cai, Y. C.; Bunnell, S. C.; Heyeck, S. D.; Berg, L. J. und Rudd, C. E. (1995): p56Lck and p59Fyn regulate CD28 binding to phosphatidylinositol 3-kinase, growth factor receptor-bound protein GRB-2, and T cell-specific protein-tyrosine kinase ITK: implications for T-cell costimulation, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 92), Nr. 19, Seite 8891-8895. URL: PM:7568038
- Rathmell, J. C.; Lindsten, T.; Zong, W. X.; Cinalli, R. M. und Thompson, C. B. (2002): Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis, *Nat.Immunol.* (Band 3), Nr. 10, Seite 932-939. URL: PM:12244308
- Rogers, P. R.; Song, J.; Gramaglia, I.; Killeen, N. und Croft, M. (2001): OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells, *Immunity.* (Band 15), Nr. 3, Seite 445-455. URL: PM:11567634
- Rutitzky, L. I.; Özkaynak, E.; Rottman, J. B. und Staderker, M. J. (2003): Disruption of the ICOS-B7RP-1 costimulatory pathway leads to enhanced hepatic immunopathology and increased gamma interferon production by CD4 T cells in murine schistosomiasis, *Infect.Immun.* (Band 71), Nr. 7, Seite 4040-4044. URL: PM:12819093
- Sakaguchi, S.; Sakaguchi, N.; Shimizu, J.; Yamazaki, S.; Sakihama, T.; Itoh, M.; Kuniyasu, Y.; Nomura, T.; Toda, M. und Takahashi, T. (2001): Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance, *Immunol.Rev.* (Band 182), Seite 18-32. URL: PM:11722621
- Salek-Ardakani, S. und Croft, M. (2006): Regulation of CD4 T cell memory by OX40 (CD134), *Vaccine* (Band 24), Nr. 7, Seite 872-883. URL: PM:16176850
- Sallusto, F.; Geginat, J. und Lanzavecchia, A. (2004): Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance, *Annu.Rev.Immunol.* (Band 22), Seite 745-763. URL: PM:15032595
- Sallusto, F.; Kremmer, E.; Palermo, B.; Hoy, A.; Ponath, P.; Qin, S.; Forster, R.; Lipp, M. und Lanzavecchia, A. (1999): Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells, *Eur.J.Immunol.* (Band 29), Nr. 6, Seite 2037-2045. URL: PM:10382767
- Salzer, U.; Maul-Pavicic, A.; Cunningham-Rundles, C.; Urschel, S.; Belohradsky, B. H.; Litzman, J.; Holm, A.; Franco, J. L.; Plebani, A.; Hammarstrom, L.; Skrabl, A.; Schwinger, W. und Grimbacher, B. (2004): ICOS deficiency in patients with common variable immunodeficiency, *Clin.Immunol.* (Band 113), Nr. 3, Seite 234-240. URL: PM:15507387
- Sander, B.; Hoiden, I.; Andersson, U.; Moller, E. und Abrams, J. S. (1993): Similar frequencies and kinetics of cytokine producing cells in murine peripheral blood and spleen. Cytokine detection by immunoassay and intracellular immunostaining, *J.Immunol.Methods* (Band 166), Nr. 2, Seite 201-214. URL: PM:8288874
- Schaerli, P.; Willmann, K.; Lang, A. B.; Lipp, M.; Loetscher, P. und Moser, B. (2000): CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function, *J.Exp.Med.* (Band 192), Nr. 11, Seite 1553-1562. URL: PM:11104798
- Shahinian, A.; Pfeffer, K.; Lee, K. P.; Kundig, T. M.; Kishihara, K.; Wakeham, A.; Kawai, K.; Ohashi, P. S.; Thompson, C. B. und Mak, T. W. (1993): Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice, *Science* (Band 261), Nr. 5121, Seite 609-612. URL: PM:7688139
- Sharpe, A. H. und Freeman, G. J. (2002): The B7-CD28 superfamily, *Nat.Rev.Immunol.* (Band 2), Nr. 2, Seite 116-126. URL: PM:11910893
- Shimizu, J.; Yamazaki, S.; Takahashi, T.; Ishida, Y. und Sakaguchi, S. (2002): Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance, *Nat.Immunol.* (Band 3), Nr. 2, Seite 135-142. URL: PM:11812990
- Shin, T.; Kennedy, G.; Gorski, K.; Tsuchiya, H.; Koseki, H.; Azuma, M.; Yagita, H.; Chen, L.; Powell, J.; Pardoll, D. und Housseau, F. (2003): Cooperative B7-1/2 (CD80/CD86) and B7-DC costimulation of

- CD4⁺ T cells independent of the PD-1 receptor, *J.Exp.Med.* (Band 198), Nr. 1, Seite 31-38. URL: PM:12847135
- Sica, G. L.; Choi, I. H.; Zhu, G.; Tamada, K.; Wang, S. D.; Tamura, H.; Chapoval, A. I.; Flies, D. B.; Bajorath, J. und Chen, L. (2003): B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity, *Immunity*. (Band 18), Nr. 6, Seite 849-861. URL: PM:12818165
- Smith, K. M.; Brewer, J. M.; Webb, P.; Coyle, A. J.; Gutierrez-Ramos, C. und Garside, P. (2003): Inducible costimulatory molecule-B7-related protein 1 interactions are important for the clonal expansion and B cell helper functions of naive, Th1, and Th2 T cells, *J.Immunol.* (Band 170), Nr. 5, Seite 2310-2315. URL: PM:12594252
- Sojka, D. K.; Bruniquel, D.; Schwartz, R. H. und Singh, N. J. (2004): IL-2 secretion by CD4⁺ T cells in vivo is rapid, transient, and influenced by TCR-specific competition, *J.Immunol.* (Band 172), Nr. 10, Seite 6136-6143. URL: PM:15128800
- Song, J.; Salek-Ardakani, S.; Rogers, P. R.; Cheng, M.; Van Parijs, L. und Croft, M. (2004): The costimulation-regulated duration of PKB activation controls T cell longevity, *Nat.Immunol.* (Band 5), Nr. 2, Seite 150-158. URL: PM:14730361
- Song, J.; Salek-Ardakani, S.; So, T. und Croft, M. (2007): The kinases aurora B and mTOR regulate the G1-S cell cycle progression of T lymphocytes, *Nat.Immunol.* (Band 8), Nr. 1, Seite 64-73. URL: PM:17128276
- Sperling, A. I.; Auger, J. A.; Ehst, B. D.; Rulifson, I. C.; Thompson, C. B. und Bluestone, J. A. (1996): CD28/B7 interactions deliver a unique signal to naive T cells that regulates cell survival but not early proliferation, *J.Immunol.* (Band 157), Nr. 9, Seite 3909-3917. URL: PM:8892622
- Spolski, R. und Leonard, W. J. (2008): Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity, *Annu.Rev.Immunol.* (Band 26), Seite 57-79. URL: PM:17953510
- Sporici, R. A.; Beswick, R. L.; von Allmen, C.; Rumbley, C. A.; Hayden-Ledbetter, M.; Ledbetter, J. A. und Perrin, P. J. (2001): ICOS ligand costimulation is required for T-cell encephalitogenicity, *Clin.Immunol.* (Band 100), Nr. 3, Seite 277-288. URL: PM:11513541
- Sprent, J. und Surh, C. D. (2002): T cell memory, *Annu.Rev.Immunol.* (Band 20), Seite 551-579. URL: PM:11861612
- Strainic, M. G.; Liu, J.; Huang, D.; An, F.; Lalli, P. N.; Muqim, N.; Shapiro, V. S.; Dubyak, G. R.; Heeger, P. S. und Medof, M. E. (2008): Locally produced complement fragments C5a and C3a provide both costimulatory and survival signals to naive CD4⁺ T cells, *Immunity*. (Band 28), Nr. 3, Seite 425-435. URL: PM:18328742
- Swallow, M. M.; Wallin, J. J. und Sha, W. C. (1999): B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNF α , *Immunity*. (Band 11), Nr. 4, Seite 423-432. URL: PM:10549624
- Tafari, A.; Shahinian, A.; Bladt, F.; Yoshinaga, S. K.; Jordana, M.; Wakeham, A.; Boucher, L. M.; Bouchard, D.; Chan, V. S.; Duncan, G.; Odermatt, B.; Ho, A.; Itie, A.; Horan, T.; Whoriskey, J. S.; Pawson, T.; Penninger, J. M.; Ohashi, P. S. und Mak, T. W. (2001): ICOS is essential for effective T-helper-cell responses, *Nature* (Band 409), Nr. 6816, Seite 105-109. URL: PM:11343123
- Tai, X.; Cowan, M.; Feigenbaum, L. und Singer, A. (2005): CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2, *Nat.Immunol.* (Band 6), Nr. 2, Seite 152-162. URL: PM:15640801
- Tang, Q.; Henriksen, K. J.; Boden, E. K.; Tooley, A. J.; Ye, J.; Subudhi, S. K.; Zheng, X. X.; Strom, T. B. und Bluestone, J. A. (2003): Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells, *J.Immunol.* (Band 171), Nr. 7, Seite 3348-3352. URL: PM:14500627
- Taylor, P. A.; Panoskaltsis-Mortari, A.; Freeman, G. J.; Sharpe, A. H.; Noelle, R. J.; Rudensky, A. Y.; Mak, T. W.; Serody, J. S. und Blazar, B. R. (2005): Targeting of inducible costimulator (ICOS) expressed on alloreactive T cells down-regulates graft-versus-host disease (GVHD) and facilitates engraftment of allogeneic bone marrow (BM), *Blood* (Band 105), Nr. 8, Seite 3372-3380. URL: PM:15618467

- Thornton, A. M.; Piccirillo, C. A. und Shevach, E. M. (2004): Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function, *Eur.J.Immunol.* (Band 34), Nr. 2, Seite 366-376. URL: PM:14768041
- Thornton, A. M. und Shevach, E. M. (1998): CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production, *J.Exp.Med.* (Band 188), Nr. 2, Seite 287-296. URL: PM:9670041
- Thorstenson, K. M. und Khoruts, A. (2001): Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25+CD4 T cells in vivo after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen, *J.Immunol.* (Band 167), Nr. 1, Seite 188-195. URL: PM:11418648
- Tomonari, K. (1988): A rat antibody against a structure functionally related to the mouse T-cell receptor/T3 complex, *Immunogenetics* (Band 28), Nr. 6, Seite 455-458. URL: PM:2972613
- Tseng, S. Y.; Otsuji, M.; Gorski, K.; Huang, X.; Slansky, J. E.; Pai, S. I.; Shalabi, A.; Shin, T.; Pardoll, D. M. und Tsuchiya, H. (2001): B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells, *J.Exp.Med.* (Band 193), Nr. 7, Seite 839-846. URL: PM:11283156
- Vermes, I.; Haanen, C.; Steffens-Nakken, H. und Reutelingsperger, C. (1995): A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V, *J.Immunol.Methods* (Band 184), Nr. 1, Seite 39-51. URL: PM:7622868
- Villegas, E. N.; Lieberman, L. A.; Mason, N.; Blass, S. L.; Zediak, V. P.; Peach, R.; Horan, T.; Yoshinaga, S. und Hunter, C. A. (2002): A role for inducible costimulator protein in the, *J.Immunol.* (Band 169), Nr. 2, Seite 937-943. URL: PM:12097399
- Vinuesa, C. G.; Cook, M. C.; Angelucci, C.; Athanasopoulos, V.; Rui, L.; Hill, K. M.; Yu, D.; Domaschensz, H.; Whittle, B.; Lambe, T.; Roberts, I. S.; Copley, R. R.; Bell, J. I.; Cornall, R. J. und Goodnow, C. C. (2005): A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity, *Nature* (Band 435), Nr. 7041, Seite 452-458. URL: PM:15917799
- Vogelzang, A.; McGuire, H. M.; Yu, D.; Sprent, J.; Mackay, C. R. und King, C. (2008): A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells, *Immunity.* (Band 29), Nr. 1, Seite 127-137. URL: PM:18602282
- Wallin, J. J.; Liang, L.; Bakardjiev, A. und Sha, W. C. (2001): Enhancement of CD8+ T cell responses by ICOS/B7h costimulation, *J.Immunol.* (Band 167), Nr. 1, Seite 132-139. URL: PM:11418641
- Walunas, T. L.; Bakker, C. Y. und Bluestone, J. A. (1996): CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation, *J.Exp.Med.* (Band 183), Nr. 6, Seite 2541-2550. URL: PM:8676075
- Wang, S.; Zhu, G.; Chapoval, A. I.; Dong, H.; Tamada, K.; Ni, J. und Chen, L. (2000): Costimulation of T cells by B7-H2, a B7-like molecule that binds ICOS, *Blood* (Band 96), Nr. 8, Seite 2808-2813. URL: PM:11023515
- Wassink, L.; Vieira, P. L.; Smits, H. H.; Kingsbury, G. A.; Coyle, A. J.; Kapsenberg, M. L. und Wierenga, E. A. (2004): ICOS expression by activated human Th cells is enhanced by IL-12 and IL-23: increased ICOS expression enhances the effector function of both Th1 and Th2 cells, *J.Immunol.* (Band 173), Nr. 3, Seite 1779-1786. URL: PM:15265908
- Watanabe, M.; Hara, Y.; Tanabe, K.; Toma, H. und Abe, R. (2005): A distinct role for ICOS-mediated costimulatory signaling in CD4+ and CD8+ T cell subsets, *Int.Immunol.* (Band 17), Nr. 3, Seite 269-278. URL: PM:15668466
- Watanabe, N.; Gavrieli, M.; Sedy, J. R.; Yang, J.; Fallarino, F.; Loftin, S. K.; Hurchla, M. A.; Zimmerman, N.; Sim, J.; Zang, X.; Murphy, T. L.; Russell, J. H.; Allison, J. P. und Murphy, K. M. (2003): BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1, *Nat.Immunol.* (Band 4), Nr. 7, Seite 670-679. URL: PM:12796776
- Watanabe, S.; Ogawa, S.; Hara, Y.; Tanabe, K.; Toma, H. und Abe, R. (2006): Expression level of costimulatory receptor ICOS is critical for determining the polarization of helper T cell function, *Transpl.Immunol.* (Band 15), Nr. 4, Seite 255-263. URL: PM:16635747

- Waterhouse, P.; Penninger, J. M.; Timms, E.; Wakeham, A.; Shahinian, A.; Lee, K. P.; Thompson, C. B.; Griesser, H. und Mak, T. W. (1995): Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl α -4, *Science* (Band 270), Nr. 5238, Seite 985-988. URL: PM:7481803
- Wilson, E. H.; Zaph, C.; Mohrs, M.; Welcher, A.; Siu, J.; Artis, D. und Hunter, C. A. (2006): B7RP-1-ICOS interactions are required for optimal infection-induced expansion of CD4⁺ Th1 and Th2 responses, *J.Immunol.* (Band 177), Nr. 4, Seite 2365-2372. URL: PM:16887998
- Wong, S. C.; Oh, E.; Ng, C. H. und Lam, K. P. (2003): Impaired germinal center formation and recall T-cell-dependent immune responses in mice lacking the costimulatory ligand B7-H2, *Blood* (Band 102), Nr. 4, Seite 1381-1388. URL: PM:12714510
- Wu, L. X.; La Rose, J.; Chen, L.; Neale, C.; Mak, T.; Okkenhaug, K.; Wange, R. und Rottapel, R. (2005): CD28 regulates the translation of Bcl-xL via the phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin pathway, *J.Immunol.* (Band 174), Nr. 1, Seite 180-194. URL: PM:15611240
- Xystrakis, E.; Boswell, S. E. und Hawrylowicz, C. M. (2006): T regulatory cells and the control of allergic disease, *Expert.Opin.Biol.Ther.* (Band 6), Nr. 2, Seite 121-133. URL: PM:16436038
- Ye, B. H.; Cattoretti, G.; Shen, Q.; Zhang, J.; Hawe, N.; de Waard, R.; Leung, C.; Nouri-Shirazi, M.; Orazi, A.; Chaganti, R. S.; Rothman, P.; Stall, A. M.; Pandolfi, P. P. und Dalla-Favera, R. (1997): The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation, *Nat.Genet.* (Band 16), Nr. 2, Seite 161-170. URL: PM:9171827
- Yoshinaga, S. K.; Whoriskey, J. S.; Khare, S. D.; Sarmiento, U.; Guo, J.; Horan, T.; Shih, G.; Zhang, M.; Coccia, M. A.; Kohno, T.; Tafuri-Bladt, A.; Brankow, D.; Campbell, P.; Chang, D.; Chiu, L.; Dai, T.; Duncan, G.; Elliott, G. S.; Hui, A.; McCabe, S. M.; Scully, S.; Shahinian, A.; Shaklee, C. L.; Van, G.; Mak, T. W. und Senaldi, G. (1999): T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS, *Nature* (Band 402), Nr. 6763, Seite 827-832. URL: PM:10617205
- Yu, D.; Tan, A. H.; Hu, X.; Athanasopoulos, V.; Simpson, N.; Silva, D. G.; Hutloff, A.; Giles, K. M.; Leedman, P. J.; Lam, K. P.; Goodnow, C. C. und Vinuesa, C. G. (2007): Roquin represses autoimmunity by limiting inducible T-cell co-stimulator messenger RNA, *Nature* (Band 450), Nr. 7167, Seite 299-303. URL: PM:18172933
- Yu, X. Z.; Liang, Y.; Nurieva, R. I.; Guo, F.; Anasetti, C. und Dong, C. (2006): Opposing effects of ICOS on graft-versus-host disease mediated by CD4 and CD8 T cells, *J.Immunol.* (Band 176), Nr. 12, Seite 7394-7401. URL: PM:16751384
- Zang, X.; Loke, P.; Kim, J.; Murphy, K.; Waitz, R. und Allison, J. P. (2003): B7x: a widely expressed B7 family member that inhibits T cell activation, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 100), Nr. 18, Seite 10388-10392. URL: PM:12920180
- Zeng, R.; Spolski, R.; Casas, E.; Zhu, W.; Levy, D. E. und Leonard, W. J. (2007): The molecular basis of IL-21-mediated proliferation, *Blood* (Band 109), Nr. 10, Seite 4135-4142. URL: PM:17234735
- Zheng, B.; Han, S. und Kelsoe, G. (1996): T helper cells in murine germinal centers are antigen-specific emigrants that downregulate Thy-1, *J.Exp.Med.* (Band 184), Nr. 3, Seite 1083-1091. URL: PM:9064325

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
A647	Alexa Fluor 647
A700	Alexa Fluor 700
APC	Allophycocyanin
Ak	Antikörper
BrdU	Bromdesoxyuridin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFSE	5, 6-Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester
CVID	Allgemeines variables Immundefektsyndrom
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
FACS	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FLICA	Fluorophor-gekoppelter Caspaseinhibitor
ICOS	Induzierbarer Ko-Stimulator
ICOS-L	Induzierbarer Ko-Stimulator Ligand
i.v.	intravenös
i.p.	intraperitoneal
JAK-STAT	Janus Kinase-Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
KO	Knock-out
LN	Lymphknoten
MACS	Magnetische Zellsortierung
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MHC	Hapthistokompatibilitätskomplex
NFAT	Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5.5	Phycoerythrin-Cy5.5

PE-Cy7	Phycoerythrin-Cy7
PerCp	Peridinin Chlorophyll-a Protein
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
RNA	Ribonukleinsäure
s.c.	subkutan
TEM	Effektor-Memory T-Zellen
TFH	Follikuläre B-Helfer T-Zellen
tg	transgen
Treg	Regulatorische T-Zellen
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
TZR	T-Zellrezeptor
WT	Wildtyp

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Andreas Hutloff, der mir die Bearbeitung dieses interessanten Themas ermöglichte. Die hervorragende wissenschaftliche Anleitung und die unermüdliche intensive Auseinandersetzung mit theoretischen und praktischen Teilaspekten in vielen gemeinsamen Diskussionen machten diese Arbeit für mich zu einem wissenschaftlichen Vergnügen. Ich danke ihm für die zahlreichen Ratschläge und Ideen sowie jegliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Richard A. Kroczeck möchte ich meinen Dank für immerwährende konstruktive Diskussionen und Hilfestellungen aussprechen.

Herrn Prof. Dr. Andreas Radbruch danke ich für die freundliche Übernahme der Betreuung an der Humboldt Universität zu Berlin.

Besonderer Dank geht an alle MitarbeiterInnen der Arbeitsgruppe P21, deren technisches Know-How, kombiniert mit absoluter Hilfsbereitschaft, meinen Arbeitsalltag tagtäglich bereicherte. Dank geht an Timo Lischke, der sein experimentelles Fachwissen freundlich an mich weitergab und oft bei den nicht allein zu bewältigenden Experimenten an meiner Seite stand. Stephanie Gurka und Sylvia Worbs, die auf (fast) jede Frage eine Antwort hatten, danke ich (nicht nur) für die technische Unterstützung, die fachlichen Diskussionen und die vielfältigen Anregungen. Dr. Hans Werner Mages möchte ich für die sympatische Arbeitsatmosphäre und die anregenden Diskussion danken. Ein Dankeschön geht auch an Dr. Martin Dörner für seine Tipps und die guten Ratschläge.

Ein herzliches Dankeschön gilt Katja Ranke und Ewa Kowalczyk für die sorgfältige Mitarbeit und die gute Laune, mit der sie stets den Laboralltag erhellten. Ich danke den Tierpflegern des Robert-Koch Instituts, die sich zuverlässig um die Tiere kümmerten. Nicole Wagner möchte ich für die intensive fachkundige Hilfe bei den tierexperimentellen Arbeiten meinen besonderen Dank aussprechen.

Dank geht auch an Thoralf Kaiser und Katharina Raba (DRFZ, Berlin), die mir bei der Sortierung der Zellen am BDaria mit fachlicher Kompetenz zur Seite standen.

Antony Coyle und Kong-Peng Lam danke ich für die Bereitstellung der ICOS-L KO bzw. ICOS KO Mäuse.

Publikationen

Originalpublikationen

Burmeister, Y.; Lischke, T.; Dahler A. C.; Mages H. W.; Lam K.-P.; Coyle A. J.; Krocze R. A. und Hutloff A. (2008): ICOS Controls the Pool Size of Effector-Memory and Regulatory T Cells, *J.Immunol.* (Band 180), Nr. 2, Seite 774-782. URL: PM:18178815

Kunze, D.; Wuttig D.; Kausch I.; Blietz C.; Blumhoff L.; **Burmeister Y.**; Kraemer K.; Fuessel S.; Toma M.; Schwenzer B.; Meye A.; Grimm M. O.; Hakenberg O. W.; Jocham D.; Wirth M. P. (2008): Antisense-mediated inhibition of survivin, hTERT and VEGF in bladder cancer cells in vitro and in vivo, *Int. J. Oncol.* (Band 32), Nr. 5, Seite 1049-1056. URL: PM:18425331

Kongressbeiträge

Dahler A.; **Burmeister Y.**; Krocze R. A.; Hutloff A., Establishment of an *in vivo* system to analyze T/B cooperation on a single cell level., *16th European Congress of Immunology*, 6.-9. September 2006, Paris (Poster).

Burmeister, Y.; Lischke, T.; Dahler A. C.; Mages H. W.; Lam K.-P.; Coyle A. J.; Krocze R. A. und Hutloff A., ICOS Controls the Pool Size of Effector-Memory and Regulatory T Cells, *37th Annual Meeting of the German Society for Immunology*, 5.-8. September 2006, Heidelberg (Poster/Vortrag).

Burmeister, Y.; Lischke, T.; Dahler A. C.; Mages H. W.; Lam K.-P.; Coyle A. J.; Krocze R. A. und Hutloff A., ICOS Controls the Pool Size of Effector-Memory and Regulatory T Cells, *German Meeting on Th1/Th2 research*, 18.-19. Juni 2008, Marburg (Vortrag).

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Yvonne Burmeister, geb. 18.05.1982 in Dresden, an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben und alle verwendeten Hilfsmittel und Quellen als solche ausgewiesen zu haben.

Des Weiteren versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nie in dieser oder anderer Form Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens war.

Die dem angestrebten Promotionsverfahren an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, den 5. November 2008

Yvonne Burmeister